RÉSOLUTION OIV-OENO 364-2012

DETERMINATION DE L'ACTIVITE POLYGALACTURONASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES (COMPLEMENT A LA RESOLUTION 10-2008)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

VU l'article 2, paragraphe 2 IV de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

CONSIDÉRANT les travaux du groupe d'experts Spécifications des produits œnologiques,

CONSIDÉRANT la résolution OENO 10/2008 adoptée en 2008 concernant la polygalacturonase

DECIDE de compléter la monographie sur la détermination de l'activité polygalacturonase OENO 10/2008 publiée dans le Codex Œnologique International par la méthode suivante:

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes parmi d'autres activités, au sein d'un complexe enzymatique, mais peuvent également être disponible sous forme purifiée, soit par purification d'un complexe de pectinase, soit produites directement par des Microorganismes Génétiquement Modifiés. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365/2009 relative aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques incluses dans le Codex Œnologique International.

1. Origine

On se reportera au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations d'enzymes qui contiennent une telle activité sont produites par fermentation dirigée, comme par exemple, d'*Aspergillus niger,* de *Rhizopus oryzae* et de *Trichoderma reesei* ou *longibrachiatum*.

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

2. Champs d'application

Référence est faite au Code International des Pratiques Œnologiques, OENO 11/04 ; 12/04; 13/04 ; 14/04 et 15/04

Ces activités enzymatiques sont utilisées pour contribuer à l'efficacité de la macération du raisin et à l'extraction du jus de raisin, pour aider à la clarification des moûts et des vins, ainsi que pour améliorer leur filtrabilité.

Détermination de l'activité polygalacturonase avec le cyanoacétamide

1. Principe

Les polygalacturonases coupent les chaînes principales des pectines (zone homogalacturanane) présentant un faible degré de méthylation. Cette activité enzymatique conduit à la libération dans le milieu d'acides galacturoniques ainsi que des oligomères d'homogalacturananes. Des extrémités à réactivités réductrices sont par conséquent libérées. Cette méthode, recourant aux ultraviolets et au cyanoacétamide et qui repose sur la réaction de Knoevenagel, à savoir la condensation entre un groupe méthylène actif et un groupe carbonyle dans un milieu fortement alcalin, permet de déterminer l'activité de diverses enzymes parmi lesquelles la polygalacturonase. Elle a été développée pour déterminer la dégradation enzymatique à mécanisme endo et exo de polysaccharides générant des oses réducteurs.

2. Équipement et matériel

- Spectrophotomètre
- Cuvette en quartz (λ=274 nm, parcours optique 1 cm)
- Balance analytique
- Agitateur magnétique et barre d'agitation
- Bain d'eau (40 °C ; 100 °C)
- Chronomètre
- Fioles jaugées (différents volumes)

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Béchers (différents volumes)
- Pipettes de précision (différents volumes)
- Spectrophotomètre
- Tubes de verre (pouvant être fermés)
- Agitateur vortex

3. Produits chimiques et réactifs

- Acide polygalacturonique ~95 % enzymatique (CAS-25990-10-7)
- Tampon pH 4,0 Na-citrate/HCl, 1,06 g/cm^3 (Titrisol), qualité p.a.
- Tampon pH 9,0 H_3BO_3/KCl/NaOH ≈0,05 M/≈0,05 M/≈0,022 M, (Titrisol), qualité p.a
- Cyanoacétamide, ≥98%, purum (CAS-107-91-5)
- Acide D-galacturonique monohydrate ≥97,0% (CAS-91510-62-02)

4. Préparation des solutions

4.1. Solution mère d'acide D-galacturonique monohydrate (250 µg/mL)

Dissoudre 0,025 g d'acide D-galacturonique monohydrate dans 100 mL de H_2O.

4.2. Solution de cyanoacétamide à 1 %

Dissoudre 1 g de cyanoacétamide dans 100 mL de H_2O

4.3. Tampon borate (pH 9,0)

Cette solution prête à l'emploi doit être diluée conformément à la description du producteur.

4.4. Tampon Na-citrate/HCl (pH 4,0)

Cette solution prête à l'emploi doit être diluée conformément à la description du

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

producteur.

4.5. Solution d'acide polygalacturonique

En agitant sans interruption, dissoudre très lentement l'acide polygalacturonique dans le tampon Na-citrate/HCl (pH 4.0.) à raison de 5 g/l.

5. Performance de la détermination de l'activité enzymatique

5.1. Courbe et procédure d'étalonnage

La gamme d'étalonnage va de 0 µg/mL à 250 µg/mL d'acide D-galacturonique. Utiliser la solution mère pour la dilution.

acide D-galacturonique monohydrate en µg/mL	0	25	50	100	150	200	250
acide D-galacturonique monohydrate en µmol/mL	0	0,118	0,236	0,471	0,707	0,943	1,178
solution mère en µL	0	100	200	400	600	800	1000
H_2O en µL	1000	900	800	600	400	200	0

Analyse au cyanoacétamide : mélanger 1 mL d'acide D-galacturonique avec 2 mL de tampon borate (pH 9) et 1 mL de solution de cyanoacétamide à 1 %. Après 10 minutes d'incubation dans un tube à essai à 100 °C, refroidir la solution dans un bain d'eau froide. Puis mesurer immédiatement l'absorbance à 274 nm. Le photomètre doit être réglé sur zéro avec de l'eau.Pour le calcul, le point d'intersection de la ligne de régression doit être réglé sur zéro.

5.2. Hydrolyse enzymatique et procédure de l'échantillon

Pour l'hydrolyse enzymatique de l'acide polygalacturonique, chauffer 10 mL de solution d'acide polygalacturonique à 40 °C dans un tube en verre pouvant être fermé. Ajouter ensuite 0,01 g de l'échantillon et incuber le mélange à 40 °C. Après exactement

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

5 min, puis exactement 10 min, prélever 500 µl de mélange réactionnel et porter directement jusqu'à 100 °C dans des tubes à essai préchauffés pendant 10 min. Diluer ensuite ces 500 µl avec de l'eau jusqu'à un volume total de 25 mL.

Pour analyser le blanc, chauffer la même concentration d'enzyme dans l'acide polygalacturonique jusqu'à 100 °C pendant 10 min (la solution d'acide polygalacturonique doit être chauffée à 100 °C avant d'ajouter l'enzyme !). En cas de turbidité, centrifuger la solution à 5 000 rpm pendant 5 min. Incuber ensuite aussi le blanc à 40 °C. Prélever 500 µl de blanc après 5 min et les placer également dans le bain d'eau à 100 °C pendant 10 min. Diluer ensuite ces 500 µl avec de l'eau jusqu'à un volume total de 25 mL.

Analyse au cyanoacétamide : ajouter 1mL de la solution diluée et 1 mL de solution de cyanoacétamide à 1 % à 2 mL de tampon borate (4.3.). Après incubation pendant 10 min dans un tube à essai à 100 °C, refroidir la solution dans un bain d'eau froide. Mesurer ensuite immédiatement l'absorbance à 274 nm.

6. Calcul de l'activité enzymatique

Calculer l'activité enzymatique en rapportant la valeur d'absorbance à la quantité de produit généré avec une gamme standard, à l'aide de la formule suivante :

Activité (U/g) = q / (t*c*F)

Activité (nkat/g) = q / (t*c*F)* 1000/60

q = quantité d'acide galacturonique en µmol/mL

t = temps en min

c = concentration de la solution enzymatique en g/L (= 0,01 g/L) pour 10 mL de substrat

F = facteur de correction du volume (= 2)

7. Bibliographie

1. Bach E. et Schollmeyer E. (1992) : Méthode de spectrophotométrie dans l'ultraviolet avec du 2-cyanoacétamide pour la détermination de la dégradation enzymatique des polysaccharides réducteurs. Anal. Biochem. 203, 335-339

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

8. Validation intra laboratoire de la détermination de l'activité polygalacturonase avec le 2-cyanoacétamide

La valeur moyenne de l'écart type a été déterminée pour 6 enzymes.

Chaque enzyme a été analysée 6 fois.

La valeur moyenne des écarts types pour les différents enzymes = 6,93 %

	Enzyme 1 5 min	Enzyme 2 5 min	Enzyme 3 5 min	Enzyme 4 5 min	Enzyme 5 5 min	Enzyme 6 5 min	Enzyme 4 10 min	Enzyme 5 10 min	Enzyme 6 10 min
Valeur moyenne (nkat/g)	7583,9	3896,4	10445,8	8751,7	16894,4	16153,1	8532,5	11608,9	14436,1
Écart type (nkat/g)	1195,6	367,1	445,3	420,4	631,4	908,7	246,48	656,3	1012,3
Écart type %	15,8	9,4	4,3	4,8	3,7	5,6	2,9	5,7	7,0
$s^2(r)$	1191221	112292	165238	147264	332227	688096	50628	358948	853983
s (r)	1091,4	335,1	406,5	383,7	576,4	829,5	225,0	599,1	924,1
Répétabilité r (nkat/g)	3088,7	948,3	1150,4	1086,0	1631,2	2347,5	636,8	1695,5	2615,2

Validation intra laboratoire de la détermination de l'activité PG avec le 2-cyanoacétamide

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 1	0,1698	0,01	389,2	6487
Enzyme 1	0,2278	0,01	593,6	9893
Enzyme 1	0,1855	0,01	444,5	7408
Enzyme 1	0,1815	0,01	430,4	7173
Enzyme 1	0,1887	0,01	455,9	7598
Enzyme 1	0,1776	0,01	416,6	6943

Enzyme 1; 5 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	7583,9		1203896,6
écart type (nkat/g)	1195,60		5333533,6
écart type %	15,77		30819,8
Variance	248,5		168555,9
$s^2(r)$	1191221,0		208,6
s(r)	1091,4		410311,4
répétabilité r (nkat/g)	3088,7	total	7147325,9

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g

Enzyme 2; 5 min	(X-MW)^2

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Enzyme 2	0,0898	0,01	215,2	3587
Enzyme 2	0,0898	0,01	215,3	3588
Enzyme 2	0,0897	0,01	214,5	3575
Enzyme 2	0,09	0,01	245,2	4087
Enzyme 2	0,0954	0,01	245,6	4093
Enzyme 2	0,0971	0,01	266,9	4448

valeur moyenne (nkat/g)	3896,4		95927,9
écart type (nkat/g)	367,08		94898,2
écart type %	9,42		103290,8
Variance	88,76		36205,6
$s^2(r)$	112292,05		38787,1
s(r)	335,10		304642,7
répétabilité r (nkat/g)	948,33	total	673752,3

Enzyme	**Absorbance 5 min**	**Concentration (mg/ml)**	**U/g**	**nkat/g**
Enzyme 3	0,4077	0,01	613,4	10223
Enzyme 3	0,3937	0,01	588,8	9813
Enzyme 3	0,4201	0,01	635,3	10588
Enzyme 3	0,4095	0,01	616,6	10277
Enzyme 3	0,4381	0,01	666,9	11115
Enzyme 3	0,4225	0,01	639,5	10658

Enzyme 3; 5 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	10445,83		49506,3
écart type (nkat/g)	445,29		400056,3
écart type %	4,26		20306,3
Variance	18,2		28617,4
$s^2(r)$	165237,7		447784,0
s(r)	406,5		45156,3
répétabilité r (nkat/g)	1150,4	total	991426,4

Enzyme	**Absorbance 5 min**	**Concentration (mg/ml)**	**U/g**	**nkat/g**
Enzyme 4	0,2032	0,01	530,4	8840
Enzyme 4	0,19614	0,01	505,5	8425
Enzyme 4	0,21	0,01	555,9	9265
Enzyme 4	0,19188	0,01	490,5	8175
Enzyme 4	0,20858	0,01	549,3	9155
Enzyme 4	0,3448	0,01	519	8650

Enzyme 4; 5 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	8751,7		7802,8
écart type (nkat/g)	420,38		106711,1
écart type %	4,80		263511,1
Variance	23,1		332544,4
$s^2(r)$	147263,9		162677,8
s(r)	383,7		10336,1
répétabilité r (nkat/g)	1086,0	total	883583,3

Enzyme	**Absorbance 5 min**	**Concentration (mg/ml)**	**U/g**	**nkat/g**
Enzyme 5	0,35063	0,01	978,1	16302
Enzyme 5	0,35329	0,01	987,5	16458
Enzyme 5	0,3812	0,01	1085,7	18095
Enzyme 5	0,35979	0,01	1010,4	16840
Enzyme 5	0,35941	0,01	1009,1	16818
Enzyme 5	0,4559	0,01	1011,2	16853

Enzyme 5; 5 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	16894,4		351385,5
écart type (nkat/g)	631,40		190192,9
écart type %	3,74		1441333,6
Variance	14,0		2964,2
$s^2(r)$	332226,5		5792,9
s(r)	576,4		1690,1
répétabilité r (nkat/g)	1631,2	total	1993359,3

Enzyme	**Absorbance 5 min**	**Concentration (mg/ml)**	**U/g**	**nkat/g**

Enzyme 6; 5 min	(X-MW)^2

© OIV 2012

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

Enzyme 6	0,30006	0,01	888,5	14808
Enzyme 6	0,3108	0,01	926,2	15437
Enzyme 6	0,3348	0,01	1010,9	16848
Enzyme 6	0,3391	0,01	1025,9	17098
Enzyme 6	0,3195	0,01	957	15950
Enzyme 6	0,5370	0,01	1006,6	16777

valeur moyenne (nkat/g)	16153,1		1808277,9
écart type (nkat/g)	908,69		513213,0
écart type %	5,63		483411,2
Variance	31,6		893550,1
s_r^2	688095,8		41231,6
s(r)	829,5		388890,8
répétabilité r (nkat/g)	2347,5	total	4128574,5

Enzyme	**Absorbance 10 min**	**Concentration (mg/ml)**	**U/g**	**nkat/g**
Enzyme 4	0,3355	0,01	498	8300
Enzyme 4	0,3569	0,01	535,8	8930
Enzyme 4	0,3340	0,01	495,4	8257
Enzyme 4	0,3420	0,01	509,5	8492
Enzyme 4	0,3472	0,01	518,6	8643
Enzyme 4	0,3448	0,01	514,4	8573

Enzyme 4; 10 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	8532,5		54056,3
écart type (nkat/g)	246,48		158006,3
écart type %	2,89		76084,0
Variance	8,3		1667,4
s_r^2	50627,5		12284,0
s(r)	225,0		1667,4
répétabilité r (nkat/g)	636,8	total	303765,3

Enzyme	**Absorbance 10 min**	**Concentration (mg/ml)**	**U/g**	**nkat/g**
Enzyme 5	0,43542	0,01	638,3	10638
Enzyme 5	0,49384	0,01	741,2	12353
Enzyme 5	0,4712	0,01	701,4	11690
Enzyme 5	0,49213	0,01	738,2	12303
Enzyme 5	0,46232	0,01	685,7	11428
Enzyme 5	0,4559	0,01	674,4	11240

Enzyme 5; 10 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	11608,9		941978,1
écart type (nkat/g)	656,31		554197,5
écart type %	5,65		6579,0
Variance	32,0		482253,1
s_r^2	358947,8		32600,3
s(r)	599,1		136079,0
répétabilité r (nkat/g)	1695,5	total	2153687,0

Enzyme	**Absorbance 10 min**	**Concentration (mg/ml)**	**U/g**	**nkat/g**
Enzyme 6	0,60886	0,01	987,9	16465
Enzyme 6	0,5221	0,01	835,1	13918
Enzyme 6	0,5180	0,01	828,0	13800
Enzyme 6	0,52344	0,01	837,5	13958
Enzyme 6	0,52895	0,01	847,2	14120
Enzyme 6	0,537	0,01	861,3	14355

Enzyme 6; 10 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	14436,1		4116390,1
écart type (nkat/g)	1012,31		268093,8
écart type %	7,01		404637,3
Variance	49,2		228271,6
s_r^2	853983,0		99926,2
s(r)	924,1		6579,0
répétabilité r (nkat/g)	2615,2	total	5123898,1

valeur moyenne des écarts types %	**6,93**

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012