

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*.

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 ($\lambda=274$ 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)

- 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/cm³ (Titrisol), qualité p.a.
- Tampon pH 9,0 H₃BO₃/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 H₂O.

4.2. Solution de cyanoacétamide à 1 %

Dissoudre 1 g de cyanoacétamide dans 100 mL de H₂O

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

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 ₂ O 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

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 :

$$\text{Activité (U/g)} = q / (t \cdot c \cdot F)$$

$$\text{Activité (nkat/g)} = q / (t \cdot c \cdot F) \cdot 1000 / 60$$

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

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; 5 min		total	(X-MW)∧2
Enzyme 1	0,1698	0,01	389,2	6487	valeur moyenne (nkat/g)	7583,9		1203896,6
Enzyme 1	0,2278	0,01	593,6	9893	écart type (nkat/g)	1195,60		5333533,6
Enzyme 1	0,1855	0,01	444,5	7408	écart type %	15,77		30819,8
Enzyme 1	0,1815	0,01	430,4	7173	Variance	248,5		168555,9
Enzyme 1	0,1887	0,01	455,9	7598	s²(r)	1191221,0		208,6
Enzyme 1	0,1776	0,01	416,6	6943	s(r)	1091,4		410311,4
					répétabilité r (nkat/g)	3088,7		7147325,9
Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g	Enzyme 2; 5 min		total	(X-MW)∧2
Enzyme 1	0,1698	0,01	389,2	6487	valeur moyenne (nkat/g)	7583,9		1203896,6
Enzyme 1	0,2278	0,01	593,6	9893	écart type (nkat/g)	1195,60		5333533,6
Enzyme 1	0,1855	0,01	444,5	7408	écart type %	15,77		30819,8
Enzyme 1	0,1815	0,01	430,4	7173	Variance	248,5		168555,9
Enzyme 1	0,1887	0,01	455,9	7598	s²(r)	1191221,0		208,6
Enzyme 1	0,1776	0,01	416,6	6943	s(r)	1091,4		410311,4
					répétabilité r (nkat/g)	3088,7		7147325,9

Enzyme 2	0,0898	0,01	215,2	3587	valeur moyenne (nkat/g)	3896,4	95927,9
Enzyme 2	0,0898	0,01	215,3	3588	écart type (nkat/g)	367,08	94898,2
Enzyme 2	0,0897	0,01	214,5	3575	écart type %	9,42	103290,8
Enzyme 2	0,09	0,01	245,2	4087	Variance	88,76	36205,6
Enzyme 2	0,0954	0,01	245,6	4093	s ² (r)	112292,05	38787,1
Enzyme 2	0,0971	0,01	266,9	4448	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; 5 min		(X-MW) ²
Enzyme 3	0,4077	0,01	613,4	10223	valeur moyenne (nkat/g)	10445,83	49506,3
Enzyme 3	0,3937	0,01	588,8	9813	écart type (nkat/g)	445,29	400056,3
Enzyme 3	0,4201	0,01	635,3	10588	écart type %	4,26	20306,3
Enzyme 3	0,4095	0,01	616,6	10277	Variance	18,2	28617,4
Enzyme 3	0,4381	0,01	666,9	11115	s ² (r)	165237,7	447784,0
Enzyme 3	0,4225	0,01	639,5	10658	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; 5 min		(X-MW) ²
Enzyme 4	0,2032	0,01	530,4	8840	valeur moyenne (nkat/g)	8751,7	7802,8
Enzyme 4	0,19614	0,01	505,5	8425	écart type (nkat/g)	420,38	106711,1
Enzyme 4	0,21	0,01	555,9	9265	écart type %	4,80	263511,1
Enzyme 4	0,19188	0,01	490,5	8175	Variance	23,1	332544,4
Enzyme 4	0,20858	0,01	549,3	9155	s ² (r)	147263,9	162677,8
Enzyme 4	0,3448	0,01	519	8650	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; 5 min		(X-MW) ²
Enzyme 5	0,35063	0,01	978,1	16302	valeur moyenne (nkat/g)	16894,4	351385,5
Enzyme 5	0,35329	0,01	987,5	16458	écart type (nkat/g)	631,40	190192,9
Enzyme 5	0,3812	0,01	1085,7	18095	écart type %	3,74	1441333,6
Enzyme 5	0,35979	0,01	1010,4	16840	Variance	14,0	2964,2
Enzyme 5	0,35941	0,01	1009,1	16818	s ² (r)	332226,5	5792,9
Enzyme 5	0,4559	0,01	1011,2	16853	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
--------	------------------	-----------------------	-----	--------	-----------------	--	---------------------

Enzyme 6	0,30006	0,01	888,5	14808	valeur moyenne (nkat/g)	16153,1	1808277,9
Enzyme 6	0,3108	0,01	926,2	15437	écart type (nkat/g)	908,69	513213,0
Enzyme 6	0,3348	0,01	1010,9	16848	écart type %	5,63	483411,2
Enzyme 6	0,3391	0,01	1025,9	17098	Variance	31,6	893550,1
Enzyme 6	0,3195	0,01	957	15950	s ² (r)	688095,8	41231,6
Enzyme 6	0,5370	0,01	1006,6	16777	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; 10 min		(X-MW) ²
Enzyme 4	0,3355	0,01	498	8300	valeur moyenne (nkat/g)	8532,5	54056,3
Enzyme 4	0,3569	0,01	535,8	8930	écart type (nkat/g)	246,48	158006,3
Enzyme 4	0,3340	0,01	495,4	8257	écart type %	2,89	76084,0
Enzyme 4	0,3420	0,01	509,5	8492	Variance	8,3	1667,4
Enzyme 4	0,3472	0,01	518,6	8643	s ² (r)	50627,5	12284,0
Enzyme 4	0,3448	0,01	514,4	8573	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; 10 min		(X-MW) ²
Enzyme 5	0,43542	0,01	638,3	10638	valeur moyenne (nkat/g)	11608,9	941978,1
Enzyme 5	0,49384	0,01	741,2	12353	écart type (nkat/g)	656,31	554197,5
Enzyme 5	0,4712	0,01	701,4	11690	écart type %	5,65	6579,0
Enzyme 5	0,49213	0,01	738,2	12303	Variance	32,0	482253,1
Enzyme 5	0,46232	0,01	685,7	11428	s ² (r)	358947,8	32600,3
Enzyme 5	0,4559	0,01	674,4	11240	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; 10 min		(X-MW) ²
Enzyme 6	0,60886	0,01	987,9	16465	valeur moyenne (nkat/g)	14436,1	4116390,1
Enzyme 6	0,5221	0,01	835,1	13918	écart type (nkat/g)	1012,31	268093,8
Enzyme 6	0,5180	0,01	828,0	13800	écart type %	7,01	404637,3
Enzyme 6	0,52344	0,01	837,5	13958	Variance	49,2	228271,6
Enzyme 6	0,52895	0,01	847,2	14120	s ² (r)	853983,0	99926,2
Enzyme 6	0,537	0,01	861,3	14355	s(r)	924,1	6579,0
						répétabilité r (nkat/g)	2615,2
						total	5123898,1

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