RÉSOLUTION OIV-OENO 363-2012

DETERMINATION DE L'ACTIVITE PECTINE MEHTYL ESTERASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES (COMPLEMENT A LA RESOLUTION OENO 9/2008)

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 9/2008 adoptée en 2008 concernant la pectine méthyl estérase

DÉCIDE de modifier le titre de la résolution 9/2008 qui devient « Détermination de l'activité pectine méthyl estérase dans les préparations d'enzymes » et de compléter la monographie sur la détermination de l'activité pectine méthyl estérase (Oeno 9/2008) publiée dans le Codex œnologique international, par la modification suivante :

DÉCIDE d'ajouter un titre à la méthode déjà existante, indiquant « Détermination de l'activité pectine méthyl estérase par dosage du méthanol » et de renuméroter les points concernés

Détermination de l'activité pectine méthyl estérase dans les préparations d'enzymes

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes au sein d'une préparation enzymatique complexe. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365-2009 relative aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques figurant 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 enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations

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

© OIV 2012

dirigées, comme par exemple, d'Aspergillus niger, d'Aspergillus oryzae, d'Aspergillus sojae, Aspergillus Tubigensis, Aspergillus Awamori, de Rhizopus oryzae et de Trichoderma longibrachiatum (T. reesei)

2. Objet / Applications

On se reportera au Code international des pratiques œnologiques, OENO 11/04 ; 12/04 ; 13/04 ; 14/04 et 15/04.

Ces activités d'enzymes sont utilisées pour faciliter la macération du raisin et l'extraction du jus de raisin et pour aider à la clarification des moûts et des vins et enfin pour améliorer leur filtrabilité.

Détermination de l'activité pectine méthyl estérase par titrage acide-base

1. Principe

L'activité de déméthylation de la pectine méthyl estérase a pour conséquence l'apparition de groupes carboxyliques libres au niveau des acides galacturoniques constituant les chaînes. Pour déterminer l'activité pectine méthyl estérase, les groupes carboxyliques peuvent être titrés au cours de l'hydrolyse enzymatique avec une solution d'hydroxyde de sodium à température constante et valeur pH constante.

2. Équipement et matériel

- équipement de titrage (burette)
- plaque chauffante à régulation thermique et agitateur magnétique / barreau magnétique
- pH-mètre
- coupelle en verre, remplie d'eau
- chronomètre
- fioles jaugées (de différents volumes)
- béchers (de préférence 50 mL)

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

© OIV 2012

- pipettes de précision (de différents volumes)
- agitateur vortex

3. Produits chimiques et réactifs

- Pectine hautement estérifiée ; qualité p.a. (Sigma P9135-100G) ; CAS 9000-69-
- Solution NaOH 0,01 M (Titrisol) qualité p.a. ; CAS 1310-73-2
- Pastilles de NaOH qualité p.a. ; CAS:1310-73-2

4. Préparation des solutions

4.1. NaOH 1 M

Dissoudre 4 g de NaOH dans 100 mL de H_2O

4.2. Solution substrat

Une solution substrat à 1 % de pectine dans H_2O est préparée par dissolution très lente de 2,0 g de pectine dans 150 mL de H_2O. Par la suite on ajuste la valeur du pH à pH 4,0 à 40 °C avec du NaOH 1 M. Il faut compléter la solution jusqu'à 200 mL précisément. Juste avant la mesure il faut à nouveau contrôler la valeur du pH et la corriger à pH 4,0 si nécessaire

4.3. Solution enzymatique

La solution enzymatique est composée à partir d'une préparation enzymatique disponible dans le commerce d'environ 30 à 50 mg/L, qui est diluée dans l'eau froide. Cette solution doit être préparée juste avant utilisation.

4.4. NaOH 0,01M

Cette solution prête à l'emploi doit être diluée conformément aux instructions du producteur.

5. Détermination de l'activité enzymatique

Verser 20 mL de solution substrat dans un bécher (agitateur magnétique en place)

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

© OIV 2012

déposé sur la plaque chauffante à régulation thermique dans une coupelle en verre, laquelle est remplie d'eau chauffée à 40 °C. Introduire l'électrode de mesure du pH dans la solution substrat. Il est nécessaire de contrôler, et éventuellement d'ajuster de nouveau la valeur du pH à 40°C avant de commencer l'analyse. Ajouter ensuite 0,1 mL de la solution enzymatique. Démarrer le chronomètre à ce moment précis. La valeur du pH doit être mesurée pendant l'analyse et l'échantillon doit être titré jusqu'au pH 4,0 avec NaOH 0,01 M pendant 10 minutes à 40 °C. Arrêter l'analyse après 10 minutes et relever la consommation de NaOH 0,01 M.

La consommation de NaOH 0,01 M devrait être de l'ordre de 3,5 mL à 8,5 mL. Dans le cas contraire, il est recommandé de diluer ou de concentrer la solution enzymatique.

6. Calcul de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est calculée à l'aide de la formule suivante :

Activité (U/mg) = n / (t*v*c)

Activité (nkat/g) = (Activité (U/g) * 1000/60) * 1000

n = consommation de NaOH 0,01 M en µmol

t = temps en minutes (dans ce cas 10 minutes)

v = quantité de solution enzymatique utilisée en mL (= 0,1 mL)

c = concentration de la solution enzymatique en g/L

Validation du titrage acide-base pour déterminer l'activité pectine méthyl estérase

La valeur moyenne de l'écart type a été déterminée pour 8 enzymes différentes.

Chaque enzyme a été analysée 6 fois.

Valeur moyenne de l'écart type des différentes enzymes : 3,91%

	Enzyme 1 40 mg/mL	Enzyme 2 40 mg/mL	Enzyme 3 40 mg/mL	Enzyme 4 40 mg/mL	Enzyme 5 40 mg/mL	Enzyme 6 40 mg/mL	Enzyme 7 30 mg/mL	Enzyme 8 50 mg/mL	Enzyme 8 30 mg/mL
Valeur moyenne (nkat/g)	14527,7	19291,7	12756,8	9534,7	9444,5	18577,8	31591,7	10888,9	9446,5
Écart type (nkat/g)	282,3	449,5	366,4	227,4	272,3	145,6	540,9	944,4	1096,1

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

© OIV 2012

Écart type %	**1,9**	**2,3**	**2,9**	**2,4**	**2,9**	**0,8**	**1,7**	**8,7**	**11,6**
s^2(r)	66410	168402	111863	43097	61786	17654	243773	743210	1001244
s (r)	257,7	410,4	334,5	207,6	248,6	132,9	493,7	862,1	1000,6
Répétabilité r (nkat/g)	729,3	1161,3	946,5	581,5	703,4	376,0	1397,3	2439,7	2831,8

Validation du titrage acide-base pour déterminer l'activité pectine méhtyl estérase

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 1	40 mg/mL	0,89	14833
Enzyme 1	40 mg/mL	0,89	14750
Enzyme 1	40 mg/mL	0,88	14667
Enzyme 1	40 mg/mL	0,85	14083
Enzyme 1	40 mg/mL	0,87	14500
Enzyme 1	40 mg/mL	0,86	14333

Enzyme 1 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	14527,7		93228,4
écart type (nkat/g)	282,30		49432,1
écart type %	1,9		19413,8
variance	3,8		197728,4
s^2(r)	66410,6		765,4
s(r)	257,7		37895,1
r (nkat/g) répétabilité	729,3	total	398463,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g

Enzyme 2 40 mg/mL	(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	40 mg/mL	1,185	19750	valeur moyenne (nkat/g)	19291,7		210069,4
Enzyme 2	40 mg/mL	1,155	19250	écart type (nkat/g)	449,54		1736,1
Enzyme 2	40 mg/mL	1,130	18833	écart type %	2,3		210069,4
Enzyme 2	40 mg/mL	1,125	18750	$s^2(r)$	168402,8		293402,8
Enzyme 2	40 mg/mL	1,190	19833	s(r)	410,4		293402,8
Enzyme 2	40 mg/mL	1,160	19333	r (nkat/g) répétabilité	1161,3		1736,1
						total	1010416,7

Enzyme	**Concentration**	**U/mg**	**nkat/g**	Enzyme 3 40 mg/mL			(X-MW)^2
Enzyme 3	40 mg/mL	0,78	13042	valeur moyenne (nkat/g)	12756,8		81320,0
Enzyme 3	40 mg/mL	0,79	13208	écart type (nkat/g)	366,38		203551,4
Enzyme 3	40 mg/mL	0,76	12708	écart type %	2,9		2384,7
Enzyme 3	40 mg/mL	0,76	12583	$s^2(r)$	111863,1		30218,0
Enzyme 3	40 mg/mL	0,77	12833	s(r)	334,5		5801,4
Enzyme 3	40 mg/mL	0,73	12167	r (nkat/g) répétabilité	946,5		347903,4

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

© OIV 2012

total	671178,8

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 4	40 mg/mL	0,57	9500
Enzyme 4	40 mg/mL	0,59	9875
Enzyme 4	40 mg/mL	0,56	9333
Enzyme 4	40 mg/mL	0,56	9250
Enzyme 4	40 mg/mL	0,58	9583
Enzyme 4	40 mg/mL	0,58	9667

Enzyme 4 40 mg/mL		(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	9534,67	1201,8
écart type (nkat/g)	227,41	115826,8
écart type %	2,4	40669,4
$s^2(r)$	43096,9	81035,1
s(r)	207,6	2336,1
r (nkat/g) répétabilité	587,5	17512,1
	total	258581,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 5	40 mg/mL	0,55	9167
Enzyme 5	40 mg/mL	0,59	9792
Enzyme 5	40 mg/mL	0,55	9083
Enzyme 5	40 mg/mL	0,57	9458

Enzyme 5 40 mg/mL		(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	9444,5	77006,3
écart type (nkat/g)	272,29	120756,3
écart type %	2,9	130682,3
$s^2(r)$	61785,6	182,3

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

© OIV 2012

Enzyme 5	40 mg/mL	0,57	9542
Enzyme 5	40 mg/mL	0,58	9625

s(r)	248,6		9506,3
r (nkat/g) répétabilité	703,4		32580,3
		total	370713,5

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 6	40 mg/mL	1,105	18417
Enzyme 6	40 mg/mL	1,118	18633
Enzyme 6	40 mg/mL	1,125	18750
Enzyme 6	40 mg/mL	1,105	18417
Enzyme 6	40 mg/mL	1,112	18533
Enzyme 6	40 mg/mL	1,123	18717

Enzyme 6 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	18577,8		25956,8
écart type (nkat/g)	145,55		3086,4
écart type %	0,8		29660,5
$s^2(r)$	17654,3		25956,8
s(r)	132,9		1975,3
r (nkat/g) répétabilité	376,0		19290,1
		total	105925,9

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 7	30 mg/mL	1,920	32000
Enzyme 7	30 mg/mL	1,947	32450

Enzyme 7 30 mg/mL		(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	31591,7	166736,1
écart type (nkat/g)	540,86	736736,1

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

© OIV 2012

Enzyme 7	30 mg/mL	1,873	31217	écart type %	1,7		140625,0
Enzyme 7	30 mg/mL	1,860	31000	$s^2(r)$	243773,1		350069,4
Enzyme 7	30 mg/mL	1,893	31550	s(r)	493,7		1736,1
Enzyme 7	30 mg/mL	1,880	31333	r (nkat/g) répétabilité	1397,3		66736,1
						total	1462638,9

Enzyme	**Concentration**	**U/mg**	**nkat/g**	Enzyme 8 50 mg/mL			(X-MW)^2
Enzyme 8	50 mg/mL	0,578	9633	valeur moyenne (nkat/g)	10888,9		1576419,8
Enzyme 8	50 mg/mL	0,682	11367	écart type (nkat/g)	944,38		228271,6
Enzyme 8	50 mg/mL	0,706	11767	écart type %	8,7		770493,8
Enzyme 8	50 mg/mL	0,712	11867	$s^2(r)$	743209,9		956049,4
Enzyme 8	50 mg/mL	0,596	9933	s(r)	862,1		913086,4
Enzyme 8	50 mg/mL	0,646	10767	r (nkat/g) répétabilité	2439,7		14938,3
						total	4459259,3

Enzyme	**Concentration**	**U/mg**	**nkat/g**	Enzyme 8 30 mg/mL	(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 8	30 mg/mL	0,69	11444
Enzyme 8	30 mg/mL	0,067	8667
Enzyme 8	30 mg/mL	0,063	8889
Enzyme 8	30 mg/mL	0,065	8429
Enzyme 8	30 mg/mL	0,07	9625
Enzyme 8	30 mg/mL	0,067	9625

valeur moyenne (nkat/g)	9446,5		3990006,3
écart type (nkat/g)	1096,13		607620,3
écart type %	11,6		310806,3
$s^2(r)$	1001243,9		1035306,3
s(r)	1000,6		31862,3
r (nkat/g) répétabilité	2831,8		31862,3
		total	6007463,5

valeur moyenne des écarts types en %	**3,91**

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

© OIV 2012