RÉSOLUTION OIV-OENO 451-2012

DETERMINATION DES ACTIVITES GLYCOSIDASES DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES - REVISION DE LA MONOGRAPHIE (OIV-OENO 5-2007)

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 la résolution OENO 5/2007 relative à la détermination de l'activité glucosidase dans les préparations enzymatiques

SUR PROPOSITION du groupe d'experts « Spécifications des produits oenologiques »,

COMPTE TENU que les molécules aromatiques sont en partie sous forme d'hétérosides ; la plupart d'entre elles sont liées à du glucose ; la mesure de l'activité enzymatique capable de couper cette liaison spécifique a fait l'objet de la monographie (Oeno 5/2007). Toutefois, cette activité n'est pas réellement opérante si le glucose est lui-même lié à un autre ose (ce qui est le cas pour la majorité de ces précurseurs aromatiques). Il s'agit essentiellement de l'apiose, de l'arabinose du rhamnose et du xylose.

AFIN de mesurer la réelle efficacité de la préparation enzymatique pour révéler le potentiel aromatique du raisin ou du vin, il convient de remplacer la monographie relative à l'activité ß-D-glucosidase par une nouvelle monographie décrivant les glycosidasesactives sur les précurseurs d'arômes hétérosidiques.

DECIDE de compléter la monographie relative à la Détermination des activités glycosidasesdans les préparations enzymatiques figurant dans le Codex OEnologique International par l'annexe suivante relative aux mesures des activités arabinofuranosidase, ß-D-galactosidase, rhamnosidase et xylosidase

Détermination de diverses activités glucosidase dans les préparations enzymatiques

□-D-galactosidase (EC 3.2.1.23 – CAS n° 9031-11-2)

□-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55 – CAS n° 9067-74-7)

□-L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40 – CAS n° 37288-35-0)

□-D-xylosidase (EC 3.2.1.37 – CAS n° 9025-53-0)

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

© OIV 2012

Spécifications générales

Ces activités enzymatiquessont généralement présentes parmi d'autres activités, au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution Oeno 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques qui figure dans le Codex Œnologique International.

1. Origine

Référence est faite au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités sont produites par fermentations directes d'*Aspergillus niger par exemple*.

2. Domaines d'applications

Référence est faite au Code international des pratiques œnologiques, OENO 16/04 et 17/04.

Les activités glycosidases sont utilisées pour révéler et rehausser les arômes des vins en se basant sur l'hydrolyse de la fraction osidiquede leurs précurseurs glycolysés. Les enzymes peuvent également être ajoutées au moût, mais leurs efficiences technologiques ne deviendront actives qu'uniquement après finalisation de la fermentation alcoolique.

3. Principe

Les préparations enzymatiques du commerce à activité glycosidases contiennent des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons glycosidiques entre le glucose et d'autres oses -notamment : l'apiose, le galactose, l'arabinose, le rhamnose et le xylose- permettant ensuite la libération des composés aromatiques liés au glucose grâce à l'activité glucosidase. De la même manière, ces enzymes peuvent hydrolyser la liaison de composés de synthèse constitués de ces différents composés osidiques et de *p*-nitrophénol. Ceci permet de mesurer ces différentes activités.

Dosage de l'activité □-D-galactosidase L'hydrolyse enzymatique du □-D-galactopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du galactose et du *para*-Nitrophenol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

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

© OIV 2012

Dosage de l'activité □-L-arabinofuranosidase

L'hydrolyse enzymatique du □-L-arabinofuranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère de l'arabinose et du *p*nitrophénol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

Dosage de l'activité □-L-rhamnosidase

L'hydrolyse enzymatique du □-L-rhamnopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du rhamnose et du *p*-nitrophénol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

Dosage de l'activité □-D-xylosidase

L'hydrolyse enzymatique du □-D-xylopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du xylose et du -*n*itrophenol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

4. Appareillage

4.1. Agitateur magnétique

4.2. Bain d'eau à 40°C

4.3. Bain d'eau à 100°C

4.4. Cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible

4.5. Glace pilée

4.6. Seringues de précision 500 – 5000 µL

4.7. Seringue de précision 100 µL

4.8. Seringue de précision 1000 µL

4.9. Spectrophotomètre

4.10. Tubes eppendorf

4.11. Fiole jaugée de 100 mL

4.12. pH mètre

4.13. Chambre froide à 4°C

4.14. Portoir métallique pour tubes eppendorf

4.15. Coton cardé

4.16. Papier Kraft

4.17. Agitateur de type vortex

4.18. Chronomètre

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

© OIV 2012

4.19. Tubes en verre de 15 mL

5. Produits

5.1. Carbonate de sodium (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM : 105,99 g/mole)

5.2. Acétate de sodium ($NaCH_3COO$ pur à 99% - PM : 82g/mole)

5.3. Acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM : 60g/mole)

5.4. *p*-nitrophénol (*p*-Np) ($C_6H_5NO_3$ pur à 99,5% - PM : 139,11 g/mole)

5.5. Eau distillée

5.6. Préparation enzymatique commerciale à analyser

et en fonction de la mesure de l'activité à considérer :

5.7a. □-D-galactopyranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N1252, 250 mg) à titre d'exemple

5.7b. □-L-arabinofuranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N3641, 10 mg) à titre d'exemple

5.7c. □-L-rhamnopyranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N7763, 100 mg) à titre d'exemple

5.7d. □-D-xylopyranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N2132, 500 mg) à titre d'exemple

6. Solutions

Pour le dosage de l'activité □-L-arabinofuranosidase ou □-L-rhamnosidase

6.1. Tampon acétate de sodium (100 mM, pH 4,4)

Il est constitué des solutions A et B.

6.1.1. Solution A : introduire 0,984 g d'acétate de sodium (5.2) dans 60 mL d'eau distillée (5.5)

6.1.2. Solution B : introduire 2 mL d'acide acétique (5.3) dans 175 mL d'eau distillée (5.5)

6.1.3. Préparation du tampon acétate de sodium : Mélanger 78 mL de solution A (6.1.1) + 122 mL de solution B (6.1.2).

Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.12).

Conserver à 4°C

Pour le dosage de l'activité □-D-galactosidase ou □-D-xylosidase

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

© OIV 2012

6.2. Tampon acétate de sodium (100 mM, pH 4,0)

Il est constitué des solutions A et B.

6.2.1. Solution A : introduire 0,984 g d'acétate de sodium (5.2) dans 60 mL d'eau distillée (5.5)

6.2.2. Solution B : introduire 2 mL d'acide acétique (5.3) dans 175 mL d'eau distillée (5.5)

6.2.3. Préparation du tampon acétate de sodium : Mélanger 36 mL de solution A (6.1.1) + 164 mL de solution B (6.1.2).

Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.12).

Conserver à 4°C

6.3. Solution réactives (en fonction de la mesure de l'activité enzymatique à considérer)

a) Solution de □-L-arabinofuranoside de p-nitrophényle 4 mM

Mettre 0,086 g de □-L-arabinofuranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).

b) Solution de □-D-galactopyranoside de p-nitrophényle 4 mM

Mettre 0,096 g de □-D-galactopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).

c) Solution de □-L-rhamnopyranoside de p-nitrophényle 4 mM

Mettre 0,091 g de □-L-rhamnopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).

d) Solution de □-D-xylopyranoside de p-nitrophényle 4 mM

Mettre 0,0868 g de □-D-xylopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).

6.4. Solution de carbonate de sodium 1M

Dissoudre 10,6 g de carbonate de sodium (5.1) dans 100 mL d'eau distillée (5.5) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11). La solution peut être stockée à 4°C (4.13).

6.5. Solution mère de *p*-nitrophénol à 125 □g/mL

Dissoudre 0,01 g de p-nitrophénol (5.4) dans 80 mL d'eau distillée (5.5).

La solution mère doit être préparée extemporanément.

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

© OIV 2012

7. Préparation de la gamme étalon de *p*-nitrophénol de 0 à 100 µg/mL

Elle est constituée à partir de la solution mère de *p*-nitrophénol (6.4.) comme indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 : Gamme étalon de *p*-nitrophénol (*p*.Np)

Quantité de *p*-Np (µg)	0	4	8	12	16	20
Concentration en *p*-Np (µg/mL)	0	20	40	60	80	100
Concentration en *p*-Np (µmol/mL)	0	0,14	0,29	0,43	0,58	0,72
Volume de solution mère (6.4) (µL)	0	16	32	48	64	80
Eau distillée (5.5) (µL)	200	184	168	152	136	120

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés extemporanément.

8.1. Solution enzymatiques

Pour le dosage de l'activité α-L-rhamnosidase ou β-D-xylosidase

Solution enzymatique à 10 g/L

Placer 1 g de préparation commerciale (5.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11), compléter avec de l'eau distillée (5.5), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

Pour le dosage de l'activité α-L-arabinofuranosidase

Solution enzymatique à 1 g/L

Placer 100 mg de préparation commerciale (5.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11), compléter avec de l'eau distillée (5.5), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

Pour le dosage de l'activité β-D-galactosidase

Solution enzymatique à 2 g/L

Placer 100 mg de préparation commerciale (5.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11),

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

© OIV 2012

compléter avec de l'eau distillée (5.5), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2. Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique (8.1) dans un tube de 15 mL (4.19), boucher avec du coton cardé (4.15) recouvert de papier Kraft (4.16) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

9. Mode opératoire

9.1. Réaction enzymatique :

Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 6 tubes eppendorf (4.10) numérotés de 1 à 6, placés dans un portoir (4.14) dans de la glace pilée (4.5) introduire

100 µL de la solution réactive à considérer (6.2), à l'aide d'une seringue de précision (4.7),

100 µL de la solution enzymatique correspondante (8.1), enclencher le chronomètre (4.18)

Après agitation (4.17), les tubes eppendorf sont placés dans le bain d'eau à 40 °C (4.2)

- Durant 2 mn pour le tube n°1
- Durant 5 mn pour le tube n°2
- Durant 10 mn pour le tube n°3
- Durant 15 mn pour le tube n°4
- Durant 20 mn pour le tube n°5
- Durant 30 mn pour le tube n°6

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 6 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 40°C, dans un bain de glace pilée (4.5)

9.2. Dosage du *p*-nitrophénol libéré

A partir des tubes eppendorf contenant les différents milieux réactionnels (9.1)

Ajouter 600 µL de solution de carbonate de sodium (6.3), à l'aide d'une seringue de

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

© OIV 2012

précision (4.8),

1,7 mL d'eau distillée (5.5), à l'aide d'une seringue de précision (4.6),

Placer le mélange résultant dans une cuve (4.4).

Mesurer aussitôt l'absorbance à 400 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.9)

(On peut également simplifier en indiquant : Voir point 9.2 de la mesure de l'activité □-D-glucosidase)

9.3. Blancs

Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). L'idéal est de réaliser la réaction enzymatique des blancs en même temps que celle de la solution enzymatique.

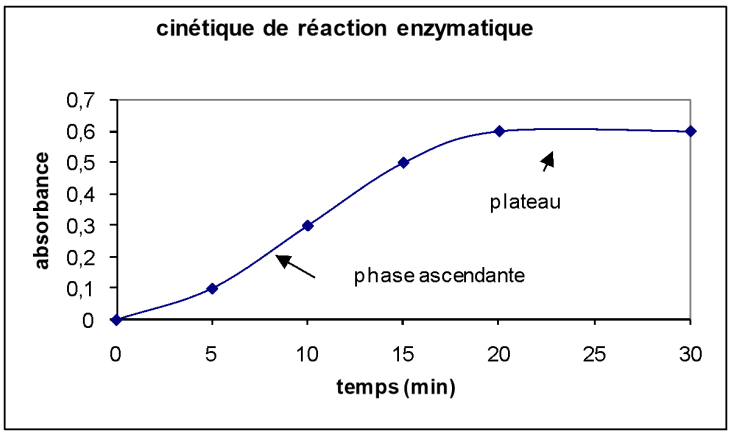
9.4. Gamme étalon

Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon de *p*-nitrophénol de 0 à 100 µg/mL (7).

10. Calculs

10.1. Réalisation d'une cinétique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).



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

© OIV 2012

Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 30 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=2 min, T=5 min, T=10 min, T=15 min, T=20 min, T=30 min.

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2. Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme étalon de *p*.nitrophénol (de 0 à 0,72 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3. Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 mn pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q de *p*-nitrophénol libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

La formule pour calculer l'activité enzymatique en U/g de préparation est la suivante :

- Activité en U/g = Q/T/V/C*1000

Avec Q : quantité de *p*-nitrophénol formé en µmoles pendant un temps T (min)

V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,1 mL

C : concentration de la solution enzymatique (g/L) ici 10 g/L

Ensuite, il est possible d'exprimer l'activité enzymatique en nanokatal. Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde dans les conditions définies par les protocoles de dosages et donc :

- Activité en nkat/g = activité en U /g *1000/60

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

© OIV 2012

11. Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois.

Le tableau suivant récapitule les résultats :

Activité	moyenne des écarts-types des valeurs	pourcentage d'erreur (%)
□-L-arabinofuranosidase	0	5
□-D-galactosidase	0,03	3,78
□-L-rhamnosidase	0,001	4,66
□-D-xylosidase	0,03	3,78

Le % d'erreur correspondant à :

- $\frac{(moyenne\ des\ écarts - types\ des\ valeurs\ \times 100)}{moyenne\ des\ valeurs\ des\ essais}$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- L'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non »
- La puissance de l'essai au risque □ de première espèce (5%) – Le risque □ de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement

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

© OIV 2012

identiques sont différents.

- Si la puissance est faible (20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.
- Si la puissance est élevée (80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2.

Dosages	**Hypothèses de l'analyse de variance**	**Probabilité**	**Puissance de l'essai (= 5%)**	**Test Newman-Keuls (*)**	**Test Bonferroni (**)**
-L-arabinofuranosidase	Respectées	0,0125	45%	Non significatif	Non significatif
-D-galactosidase	Respectées	0,01	75%	Non significatif	Non significatif
-L-rhamnopyranoside	Respectées	0,006	65%	Non significatif	Non significatif
-D-xylosidase	Respectées	0,0253	73%	Non significatif	Non significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque de première espèce choisi

** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t (t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%, renforcée par une appartenance à un même groupe (Test Newmann-Keuls non significatif) et considérée comme non différente au risque de première espèce (Test

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

© OIV 2012

Bonferroni non significatif).

12. Bibliographie

1. M. Lecas. Thèse de Doctorat, 1994. Composition et structure des polymères constitutifs des parois cellulaires de la pellicule de la baie de raisin. Application d'enzymes fongiques liquéfiant les parois à fins d'extraction des substances odorantes.
2. Dugelay. Thèse de Doctorat, 1993. L'arôme du raisin : étude des précurseurs hétérosidiques et des activités enzymatiques exogènes impliquées dans leur hydrolyse – Applications technologiques.

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

© OIV 2012