RÉSOLUTION OIV-OENO 412-2012

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENDO-α(1,5) ARABINANASE DANS LES PRÉPARATIONS D'ENZYMES PECTOLYTIQUE

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,

CONSIDERANT la Résolution OIV/OENO 13/04, 11/04, 12/04, 15/04 adoptée par l'OIV en

2004

CONSIDERANT la Résolution OIV-OENO-365/2009 sur la fiche générale sur les préparations d'enzymes

SUITE À La proposition du groupe d'experts « Spécification des produits œnologiques »

DECIDE de compléter le « Codex œnologique international » par la monographie suivante sur l'activité endo-α-1,5 arabinanase :

Détermination de l'activité endo-α(1,5) arabinanase dans les préparations d'enzymes pectolytiques

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes parmi d'autres activités, au sein d'un complexe enzymatique. Sauf stipulation 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

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

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées de microorganismes comme par exemple l''Aspergillus niger, Aspergillus Tubigensis, Aspergillus Awamori Trichoderma reesei, Penicillium funiculosum, ou les

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

© OIV 2012

Arabinanases appartiennent à la famille des glycohydrolases.

2. Objet / Champ d'application

Référence est faite au Code International des Pratiques Œnologiques, Oeno 11/04; 12/04; 13/04; 14/04 and 15/04.

Les arabinanases sont utiles pour la macération des raisins, la clarification des moûts et des vins, la filtrabilité des moûts et des vins, car elles ont des propriétés facilitant l'action d'autres activités enzymatiques, par l'hydrolyse des constituants de la paroi cellulaire du raisin.

3. Principe

Le substrat utilisé est de l'arabinane débranché à liaisons croisées azurine (AZCL-Arabinane). L'arabinane hautement purifié extraite de pulpe de betterave sucrière est traitée avec de l'□-L-arabinofuranosidase afin d'éliminer les résidus d'arabinofuranosyle à liaison α-1,3 et □-1,2, conservant l'arabinane α-1,5 linéaire. Ce polysaccharide conserve un faible pourcentage d'acide galacturonique, galactose et rhamnose (6,4 et 2 % respectivement), mais résiste à l'attaque de la polygalacturonase et de l'endo-1,4-β-D-galactanase. Le polysaccharide est ensuite coloré et réticulé. Le traitement de ce substrat avec une quantité largement excessive de α-L-arabinofuranosidase entraîne une libération limitée d'arabinose mais aucune libération de fragments marqués par le colorant.

L'AZCL-Arabinane est un substrat très sensible et très spécifique pour l'analyse de l'endo-arabinanase, permettant de mesurer le surnageant à 590 nm après la réaction.

4. Appareillage

4.1. Tubes à essais en verre (15 mL)

4.2. Bain-d'eau réglé à 40 °C

4.3. Agitateur-mélangeur à Vortex

4.4. Filtre circulaire qualitatif retenant les particules de diamètre : 11µm (en solution liquide)

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

© OIV 2012

4.5. Cuvettes avec trajet optique de 1 cm

4.6. Spectrophotomètre réglé à 590 nm

4.7. Chronomètre

4.8. Pipette (500 µl, 10 mL)

4.9. pH-mètre

4.10. Tubes à essais en verre de 15 mL

4.11. Portoir métallique pour tubes à essais de 15 mL

4.12. Entonnoir

4.13. Fiole jaugée de 100 mL

5. Réactifs et produits :

5.1. Comprimés d'arabinazyme (Megazyme, lot 60701) par exemple

5.2. Base Trizma (CAS N°. 77-86-1)

5.3. Acide acétique glacial (CAS N°. 64-19-7)

5.4. Solution d'hydroxyde de sodium (CAS N°. 1310-73-2)

6. Solutions

6.1. Tampon de dilution

(Tampon d'acétate de sodium, 50 mM, pH 4,0)

De l'acide acétique glacial est versé dans 900 mL d'eau distillée. Cette solution est ajustée à pH 4,0 par ajout de solution d'hydroxyde de sodium 1 M. Le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillée.

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

© OIV 2012

6.2. Solution à 2 % de base Trizma

2 g de base Trizma sont dilués dans 100 mL d'eau distillée.

7. Préparation de l'échantillon

7.1. Dilution de l'enzyme

Pour la plupart des préparations commerciales de pectinases, une dilution 500 fois est nécessaire. Placer 200 mg de préparation commerciale dans une fiole jaugée de 100 mL, compléter avec le tampon de dilution (6.1), et agiter afin d'obtenir un mélange homogène.

8. Procédure

8.1. Réaction enzymatique

Préparer les tubes à essais au moins en double.

Diluer 500 μL d'enzyme dans le tampon de dilution (7.1) et pré-équilibrer à 40 °C pendant 5 mn.

Déclencher la réaction en ajoutant un comprimé d'arabinazyme. Démarrer le chronomètre.

Le comprimé s'hydrate rapidement. Ne pas agiter la suspension.

Après exactement 10 mn à 40 °C, mettre fin à la réaction en ajoutant 10 mL de solution de base Trizma (6.2) et agiter.

Laisser reposer approximativement 5 mn à température ambiante, puis agiter de nouveau la suspension épaisse et filtrer avec un filtre circulaire qualitatif.

Mesurer ensuite l'absorbance des solutions de réaction à 590 nm par rapport au blanc de réaction

8.2. Blanc de réaction

Préparer un blanc de réaction en versant 10 mL de solution de base Trizma (6.2) dans 500 μl de solution d'enzyme et agiter avant d'ajouter le comprimé d'arabinazyme.

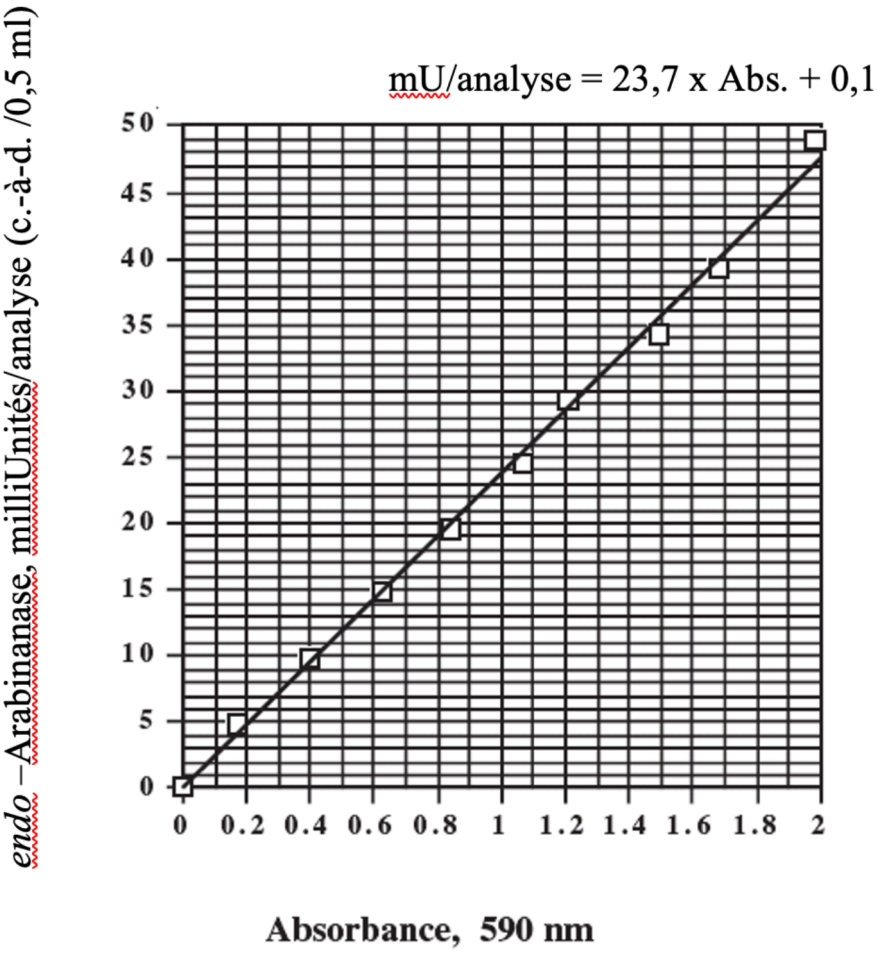
9. Calculs

L'activité endo-arabinanase analysée est déterminée par rapport à la courbe

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

© OIV 2012

d'étalonnage du kit d'essai (à savoir le Lot. No. 60701)



$$Y = MX + C * 2 * F_V / 1000 \quad [U/g \text{ ou } ml]$$

Où :

- Y activité endo-arabinase (en milliUnités/analyse
- M pente de la courbe d'étalonnage
- X absorbance de la réaction à 590 nm (moins le blanc de réaction, ou lecture par rapport au blanc de réaction)

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

© OIV 2012

- C intersection sur l'axe Y (ordonnée à l’origine)
- 2 conversion de 0,5 mL de dilution d'enzyme à 1 mL lors de l'essai
- FV facteur de dilution de la préparation enzymatique originale (c.-à-d. 500 fois)
- 1000 conversion de milliUnités en Unités

10. Bibliographie

1. http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/T-ARZ200.pdf
2. Dietrich H., Will F. (1998); Vom Phänomen der Trübung; Getränkeindustrie; 2; S. 80 – 88.

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

© OIV 2012