RÉSOLUTION OIV/OENO 313/2009

CODEX - HEMICELLULASES

L'ASSEMBLEE GENERALE

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,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et du groupe d'experts « Spécifications des produits œnologiques »,

DECIDE de compléter le Codex Œnologique international par la monographie suivante :

HEMICELLULASES (activité galactanase)

(EC 3.2.1.89 – CAS n° 58182-40-4)

Spécifications générales

Ces enzymes ne sont pas trouvées à l'état pur mais elles sont présentes au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indications contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution concernant « les spécifications générales pour les préparations enzymatiques » qui figurent dans le Codex œnologique international.

1. Origine et application

Les hemicellulases catalysent la dégradation des hémicelluloses (galactanes, xyloglucanes, arabinoxylanes, glucuronoarabinoxylanes, mannanes, glucomannanes). Elles sont utilisées lors de la macération du raisin. Cette activité peut être estimée par l'hydrolyse des galactanes de pomme de terre.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées *d'Aspergillus niger* et/ou de mélange *Aspergillus niger – Trichoderma reesei*.

Activités principales accompagnant les activités Hémicellulases (arabanase, galactanase, xylanase, rhamnosidase) :

- Polygalacturonases
- Pectine / pectatelyase

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

- Pectine méthyle estérase

Activités secondaires : protéases, cellulases, bêta-glucosidases. La clause des 50 % est applicable pour ces activités (monographie sur les préparations enzymatiques 4.1)

2. Domaine d'application

La méthode de dosage a été mise au point à l'aide d'une galactanase commercialisée. Les conditions et la méthode ont été développées pour l'application aux préparations enzymatiques commerciales telles que retrouvées sur le marché œnologique.

3. Principe

Les galactanases coupent les chaînes d'arabinogalactane et libèrent ainsi les extrémités réductrices des sucres constitutifs. La mesure de l'activité galactanase est basée sur le dosage du galactose selon la méthode de NELSON (1994). En milieu alcalin, le groupement pseudoaldéhydique des sucres réduit les ions cuivriques Cu^{2+}. Ces derniers réagissent avec le réactif arséniomolybdique en donnant une coloration bleue dont l'absorbance, mesurée à 520 nm, varie de manière linéaire avec la concentration en oses (entre 0 et 400 ¤g/mL).

4. Appareillage

4.1. Agitateur magnétique chauffant

4.2. Bain d'eau à 40°C

4.3. Bain d'eau à 100°C

4.4. Vase cylindrique de 100 mL

4.5. Centrifugeuse pouvant recevoir des tubes en verre de 15 mL

4.6. Chronomètre

4.7. Fiole jaugées de 100 mL

4.7.1. Fiole jaugée de 500 mL

4.8. Seringue de précision 200 µL

4.8.1. Seringue de précision 1 mL

4.9. Pipette droite de 10 mL graduée au 1/10^{e} de mL

4.10. Spectrophotomètre

4.11. Tubes en verre de 15 mL

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

4.12. Agitateur de type vortex

4.13. Flacon en verre brun de 500 mL.

4.14. Chambre à 4°C

4.15. Étuve à 37°C

4.16. Coton cardé

4.17. Papier Kraft

4.18. pH mètre

4.19. Portoir métallique pour tubes de 15 mL

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

5. Produits

5.1. Acétate de sodium (CH_3COONa pur à 99% - PM = 82g/mole)

5.2. Acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM = 60 g/mole, densité = 1,058)

5.3. Galactane de pomme de terre (Megazyme, lot 71201) à titre d'exemple. Si ce substrat n'est pas disponible, les substrats alternatifs doivent être validées pour cet essai.

5.4. Sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4 pur à 99,5% - PM = 142 g/mole)

5.5. Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM = 105,99 g/mole)

5.6. Tartrate de potassium et de sodium ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ pur à 99% - PM = 282,2 g/mole)

5.7. Hydrogénocarbonate de sodium anhydre ($NaHCO_3$ pur à 98% - PM = 84,01 g/mole)

5.8. Sulfate de cuivre penta-hydraté ($CuSO_45H_2O$ pur à 99% - PM = 249,68 g/mole)

5.9. Acide sulfurique (H_2SO_4 pur à 98%) concentré

5.10. Heptamolybdate d'ammonium ($(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$ pur à 99% - PM = 1235,86 g/mole)

5.11. Hydrogénoarséniate de sodium ($Na_2HAsO_4.7H_2O$ pur à 98,5% - PM = 312,02 g/mole)

5.12. D-galactose ($C_6H_{12}O_6$ pur à 99% - PM = 180,16 g/mole)

5.13. Eau distillée

5.14. Préparation enzymatique commerciale à analyser

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

6. Solutions

6.1. Réactifs de la solution oxydante

Ces réactifs devront être préparés en premier, compte-tenu du délai de 24 heures pour la solution D.

6.1.1. Solution A :

Placer dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) successivement

20 g de sulfate de sodium anhydre (5.4)

2,5 g de carbonate de sodium anhydre (5.5)

2,5 g de tartrate de potassium et de sodium (5.6)

2 g de hydrogénocarbonate de sodium anhydre (5.7)

Dissoudre dans 80 mL d'eau distillée (5.13). Chauffer (4.1) jusqu'à dissolution et transvaser dans une fiole de 100 mL (4.7). Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée (5.13).

Conserver à 37 °C (4.15) ; s'il se forme un dépôt : filtrer sur filtre plissé.

6.1.2. Solution B :

Dissoudre 15 g de sulfate de cuivre penta-hydraté (5.8) dans 100 mL d'eau distillée (5.13) et ajouter une goutte d'acide sulfurique concentré (5.9).

6.1.3. Solution C :

Cette solution est préparée extemporanément pour avoir une bonne proportionnalité entre la densité de couleur et la quantité de glucose en mélangeant 1 mL de solution B (6.1.2) avec 24 mL de solution A (6.1.1).

6.1.4. Solution D :

Dans une fiole jaugée de 500 mL (4.7.1), dissoudre 25 g de heptamolybdate d'ammonium (5.10) dans 400 mL d'eau (5.13). Ajouter 25 mL d'acide sulfurique concentré (5.9) (refroidi sous courant d'eau froide).

Dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) dissoudre 3 g d'hydrogénoarséniate de sodium (5.11) dans 25 mL d'eau (5.13) et transvaser quantitativement dans la fiole jaugée de 500 mL (4.7.1) contenant le molybdate d'ammonium (5.10).

Compléter avec de l'eau (5.13) pour avoir un volume final de 500 mL.

Placer à 37°C (4.15) pendant 24 heures puis conserver à 4°C (4.14) dans un flacon en

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

verre brun de 500 mL (4.13).

6.2. Tampon acétate de sodium

(pH 4,2, 100 mmol/L)
Il est constitué des solutions A et B.

6.2.1. Solution A

Acétate de sodium 0,1 M : dissoudre 0,5 g d' acétate de sodium (5.1) dans 60 mL d'eau distillée (5.13)

6.2.2. Solution B :

Acide acétique 0,1 M : étendre 1 mL d'acide acétique (5.2) par 175 mL d'eau distillée (5.13)

6.2.3. Préparation du tampon acétate de sodium :

Mélanger 23,9 mL de solution A (6.2.1) + 76,1 mL de solution B (6.2.2).
Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.18).
La solution doit être conservée à 4°C (4.14).

6.3. Solution de galactane de pomme de terre à 1% (p/v)

Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7) dissoudre 1 g de galactane de pomme de terre (5.3) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.2).

6.4. Solution mère de Galactose à 400µg/mL

Dissoudre 0,040 g de galactose (5.12) dans 100 mL d'eau distillée (5.13).

7. Préparation de la gamme étalon de galactose

Une gamme étalon est réalisée à partir de la solution mère de galactose (de 0 à 400 µg/mL) (6.4) telle que présentée dans le tableau 1.
Tableau 1 : gamme étalon de galactose

Galactose (µg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	400
Galactose (µmole/mL)	0	0,278	0,555	0,833	1,110	1,388	1,665	2,220

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

Vol solution mère (µL) (6.4.)	0	125	250	375	500	625	750	1000
Vol eau distillée (µL) (5.13)	1000	875	750	625	500	375	250	0

8. Préparation de l'échantillon

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

8.1. Solution enzymatique à 2 g/L

Placer 200 mg de préparation commerciale (5.14) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), compléter avec de l'eau distillée (5.13), agiter afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2. Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) dans un tube de 15 mL (4.11), boucher avec du coton cardé (4.16) recouvert de papier Kraft (4.17) 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 5 tubes de 15 mL (4.11) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.19) introduire

200 µL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8)

400 µL de tampon acétate de sodium (6.2), à l'aide de la seringue de précision (4.8.1),

600 µL de galactane de pomme de terre (6.3), enclencher le chronomètre (4.6)

Après agitation (4.12), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.16) et du papier Kraft (4.17) sont placés dans le bain d'eau à 40 °C (4.2)

- Durant 1 mn pour le tube n°1
- Durant 2 mn pour le tube n°2
- Durant 5 mn pour le tube n°3

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

- Durant 10 mn pour le tube n°4
- Durant 15 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 40°C, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.
Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

9.2. Dosage des substances réductrices libérées (ici le galactose)

Dans un tube de 15 mL (4.11)
Placer 1 mL du milieu réactionnel (9.1)
Ajouter 1 mL de solution C (6.1.3)
Après agitation (4.12), le tube est placé dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.
Le tube est ensuite refroidi sous courant d'eau froide.
Ajouter 1 mL de la solution D (6.1.4)
Ajouter 9,5 mL d'eau (5.14) à l'aide de la pipette droite de 10 mL (4.9)
Attendre 10 mn pour la stabilisation de la couleur.
Centrifuger (4.5) chacun des tubes à 5000 rpm durant 10 mn.
Placer le surnageant dans une cuve (4.20).
Mesurer aussitôt l'absorbance à 520 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.10).

9.3. Blancs

Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 2 g/l (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 galactose de 0 à 400 µg/mL (7).

10. Calcul

10.1. Réalisation d'une cinétique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI
© OIV 2009

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).

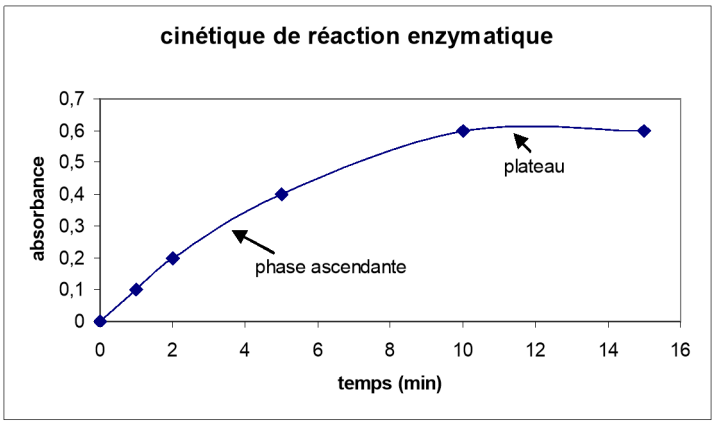


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 15 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min T=15 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 galactose (de 0 à 2,220 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente (Q/T) de 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 galactose

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

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 :

- $Activité\ en\ U/g = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$

Avec Q : quantité de galactose formé en µmoles pendant un temps T (min)
V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,2 mL
C : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 2 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 :

- $Activité\ en\ nkat/g = (activité\ en\ U/g) \times (1000/60)$

11. Caractéristiques de la méthode

- r= 0.056
- **R= 0.056**
- **Sr= 0.02**
- **S_R= 0.02**

La répétabilité 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. Ainsi, pour le dosage de la galactanase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,02 avec un pourcentage d'erreur de 9,7%. Le % d'erreur correspondant à :

- $\dfrac{moyenne\ des\ écarts - types\ des\ valeurs\ \times 100}{moyenne\ des\ valeurs\ des\ essais}$

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

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

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 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 (**)
Galactanase	Respectées	0,00087	93%	Significatif	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 Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

Bonferroni non significatif).

12. Références Bibliographiques

1. NELSON N., **A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose**. The may Institute for medical research of the Jewish hospital, 1944. p 375-380
2. Thierry Doco, et al. : « Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides, Carbohydrate Polymers, Volume 53, Issue 3, 15 August 2003, Pages 253-261, »)

© OIV 2009

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3rd July 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI