RÉSOLUTION OIV/OENO 314/2009

CODEX - PECTINELYASE

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 et du groupe d'experts « Spécifications des produits œnologiques »

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

PECTINELYASE (activité PECTINELYASE)

EC 4.2.2.10. – CAS n° 9033-35-6)

Spécifications générales

Ces enzymes ne sont pas trouvées à l'état pur mais elles sont présentes au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indications contraires, 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 oenologique

Ces activités sont utilisées pour favoriser la macération du raisin, pour la clarification des moûts et des vins, pour améliorer la filtrabilité des moûts et des vins et le pressurage du raisin.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées d'*Aspergillus niger.*

Activités principales accompagnant l'activité Pectinelyase :

- Polygalacturonase
- Pectine méthyle estérase

Activités secondaires : Peuvent être considérées comme activités secondaires, mais également fort utiles au processus d'hydrolyse des substances pectiques, diverses

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

© OIV 2009

hémicellulases telles que les xylanases ainsi que des cellulases. Dans ce cas, compte tenu de leur utilité, il n'est pas approprié d'appliquer à ces activités la clause de la résolution, sur les préparations enzymatique, qui demande que la somme des activités secondaires ne doit pas être supérieure à 50 % de la somme des activités nécessaires à la fonction recherchée puis qu'elles contribuent utilement à l'atteinte du but.

Par contre, la clause des 50% s'applique pour les activités secondaires suivantes : protéases, bêta-glucosidases

2. Domaine d'application

La méthode de dosage a été mise au point à l'aide d'une pectinelyase commercialisée (5.5). Les conditions et la méthode ont été développées pour l'application aux préparations enzymatiques du commerce telles que retrouvées sur le marché œnologique.

3. Principe

Cette activité enzymatique se traduit par une dégradation des pectines hautement méthylées par □-élimination des acides galacturoniques méthylés. Il se crée ainsi un système de doubles liaisons conjuguées fortement délocalisées et absorbant dans l'ultra violet.

4. Appareillage

4.1. agitateur magnétique

4.2. Bain d'eau à 25°C

4.3. Bain d'eau à 100°C

4.4. Fiole jaugée de 1000 mL

4.4.1. fiole jaugée de 100 mL

4.5. Chronomètre

4.6. Cuves de 1 cm de trajet optique en quartz, pour spectrophotomètre, pour mesure dans l'UV

4.7. pH mètre

4.8. Seringues de précision 100 µL

4.8.1. Seringues de précision 1000 µL

4.9. Spectrophotomètre

4.10. Tubes de 15 mL

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

© OIV 2009

4.11. Agitateur de type vortex

4.12. Portoir métallique pour tubes de 15 mL

4.13. Chambre à 4°C

4.14. Coton cardé

4.15. Papier Kraft

5. Produits

5.1. Pectine d'agrume de degré d'estérification 63-66% (Pectin from citrus peel, Fluka, Réf. 76280), à titre d'exemple.

5.2. Hydroxyde de sodium (NaOH, pur à 99% - PM = 40 g/mole)

5.3. Acide citrique ($C_6H_8O_7.H_2O$, pur à 99,5% - PM = 210,14 g/mole)

5.4. Dihydrogénophosphate de sodium ($NaH_2PO_4.2H_2O$, pur à 99% - PM = 156,01 g/mole)

5.5. Pectinelyase d'*Aspergillus niger* purifiée (Sigma ; 30 U; 50-150 U/mg prot, réf : P7052), à titre d'exemple. Une unité, entraîne une variation d'absorbance à 235 nm de 1 par minute à 40 °C.

5.6. Eau distillée

5.7. Préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1. Solution d'Hydroxyde de sodium 1M

Introduire 40 g d'hydroxyde de sodium (5.2) dans une fiole jaugée de 1000mL (4.4) et compléter avec de l'eau distillée (5.6).

6.2. Tampon Mc Ilvaine (Devries *et al.*).

Il est constitué des solutions A et B.

6.2.1 Solution A : acide citrique à 100 mM : dissoudre 4,596 g d'acide citrique (5.3) dans 200 mL d'eau distillée (5.6)

6.2.2 Solution B : dihydrogénophosphate de sodium à 200 mM : dissoudre 6,25 g de dihydrogénophosphate de sodium (5.4) dans 200 mL d'eau distillée (5.6).

6.2.3 Préparation du tampon Mac Ilvaine

Mélanger 50% de solution A (6.2.1) + 50% de solution B (6.2.2) et ajuster le pH à 6 à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium (6.1).

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

© OIV 2009

La solution doit être conservée à 4°C (4.13). Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.7)

6.3. Solution de Pectine d'agrume à 1% (p/v)

Dissoudre 0,5 g de pectine (5.1) dans 50 mL de tampon Mc Ilvaine (6.2).

7. Préparation de l'échantillon

7.1. Solution enzymatique à 10 g/l

Placer 1g de préparation commerciale (5.7) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.4.1), compléter avec de l'eau distillée (5.6), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

7.2. Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 10 g/l (7.1) dans un tube de 15 mL (4.10), boucher avec du coton cardé (4.14) recouvert de papier Kraft (4.15) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

8. Mode opératoire

8.1. Réaction enzymatique :

Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 5 tubes de 15 mL (4.10) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.12) introduire

400 µL de Tampon Mc Ilvaine (6.2) à l'aide d'une seringue de précision 1000 µL (4.8.1)

100 µL de la solution enzymatique à 10 g/l (7.1) à l'aide d'une seringue de précision 100 µL (4.8)

500 µL de solution de pectine d'agrume (6.3), enclencher le chronomètre (4.5)

Après agitation (4.11), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.14) et du papier Kraft (4.15), sont placés dans le bain d'eau à 25°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
- Durant 10 mn pour le tube n°4

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

© OIV 2009

- Durant 15 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée par un réchauffement rapide (30 secondes max) en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) et en ajoutant des solutions concentrées acide ou basique comme réactif d'arrêt . Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

8.2. Dosage des substances libérées

Le milieu réactionnel (8.1) est dilué au dixième avec de l'eau distillée (5.6). La dilution est placée dans une cuve (4.6) de 1 cm de parcours optique. Mesurer aussitôt l'absorbance à 235 nm, à l'aide d'un spectrophomètre (4.9).

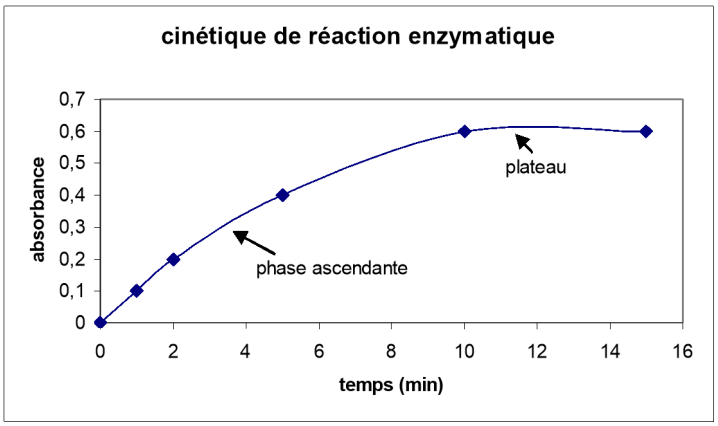
8.3. Blancs

Opérer comme décrit en 8.1 en remplaçant la solution enzymatique par le blanc dénaturé par chauffage (7.2).

9. Calculs

9.1. 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 Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

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

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 la pente (DO/T) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

9.2. Calcul de l'activité enzymatique

Le calcul de l'activité enzymatique de la pectinelyase s'effectue grâce au coefficient d'extinction molaire de la molécule formée (□ = 5500 $M^{-1}cm^{-1}$). Ainsi la formule a appliquer est la suivante :

- $Activité\ en\ U/g = (DO_T/T)/(0.1/V) \times (1000/(5.5/C)$

Avec DO_T : Valeur de l'absorbance au 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

Il est désormais possible d'exprimer d'ativité enzyatique en nanokatals. Cet unité corresponds aux nombres de nanomoles de produit formés par seconde sous les conditions définies par les protocoles de détermination et par conséquence :

- Activité en nkat/g= (activité en U/g) x (1000/60)

10. Caractéristiques de la méthode

- r= 0.056
- R= 0.056
- Sr= 0.02

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

© OIV 2009

- 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 pectine lyase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,01 avec un pourcentage d'erreur de 4,66. 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 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 1.

Dosages	Hypothèses de l'analyse de variance	Probabilité	Puissance de l'essai (□ = 5%)	Test Newman-Keuls (*)	Test Bonferroni (**)

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

© OIV 2009

PL	Respectées	0,00725	87%	Significatif	Significatif

Tableau 1 : 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%.

11. Références Bibliographiques

1. DE VRIES J.A., F. M. Rombouts F.M., VORAGEN A.G.J., PILNIK W. **Enzymatic degradation of apple pectins.** Carbohydrate Polymers, 2, 1982, 25-33.

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

© OIV 2009