RÉSOLUTION OENO 9/2008

CODEX - PECTINE METHYL-ESTERASE

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 :

PECTINE METHYL-ESTERASE

(activité Pectine Méthyl-Estérase) (PME)

(EC 3.1.1.11 – CAS n° 9025-98-3)

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 oeno 14/2003 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 Pectine Methyl Estèrase:

- Polygalacturonase
- Pectine lyase

Activités secondaires : Peuvent être considérées comme activités secondaires, mais

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

également fort utiles au processus d'hydrolyse des substances pectiques, diverses activités enzymatiques telles que les arabananases, galactanases, rhamosidases, et xylanases ainsi que des cellulases. Dans ce cas, compte tenu de leur utilité, il n'est pas approprié d'appliquer la clause de la résolution 14/2003 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 pectine estérase commercialisée (5.2). 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

Il s'agit d'une activité de déméthylation de la pectine qui entraîne l'apparition de groupements carboxyliques libres au niveau des acides galacturoniques constitutifs des chaînes.

L'activité Pectine Méthyl-Estérase est estimée par dosage du méthanol selon la méthode de Klavons & Bennet (1986). L'alcool oxydase de *Pichia pastoris* est spécifique des alcools primaires de faible masse molaire et catalyse l'oxydation du méthanol en formaldéhyde. La pentane-2,4-dione se condense exclusivement avec des aldéhydes de faible poids moléculaire tel le formaldéhyde en formant un composé chromophore absorbant à 412 nm.

4. Appareillage

4.1. Bain d'eau à 25°C

4.2. Bain d'eau à 30°C

4.3. Bain d'eau à 60°C

4.4. Bain d'eau à 100°C

4.5. Vase cylindrique de 100 mL

4.6. Chronomètre

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

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

4.8. Fiole jaugée d'1 L

4.9. Fiole jaugée de 100 mL

4.10. pH mètre

4.11. Seringue de précision 500-5000 µL

4.12. Seringue de précision 100-1000 µL

4.13. Seringue de précision 0-200 µL

4.14. Seringue de précision 0-20 µL

4.15. Spectrophotomètre

4.16. Tubes en verre de 15 mL à vis étanches

4.17. Portoir métallique pour tubes de 15 mL

4.18. Agitateur de type vortex

4.19. Agitateur magnétique

5. Produits

5.1. Pectine d'agrume de degré d'estérification de 63-66%. (Pectines *ex-citrus* : Fluka, réf :76280) à titre d'exemple.

5.2. Pectine estérase de peau d'orange (Fluka ; 20 U/mg, réf :76286) à titre d'exemple.

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

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

5.5. Alcool oxydase de *Pichia Pastoris* (Sigma, 250 U ; 0.2 mL, réf : A2404) à titre d'exemple. Une unité d'alcool oxydase oxyde une µmole de méthanol en formaldéhyde par minute à pH 7,5 et 25°C.

5.6. Acétate d'ammonium (CH_3COONH_4, pur à 99,5% - PM = 77,08g/mole)

5.7. Pentane-2,4-dione ($C_5H_8O_2$ - PM = 100,12g/mole)

5.8. Méthanol (CH_3OH, Analytical Reagent Grade - PM = 32g/mole)

5.9. Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4, pur à 99% - PM = 136,06 g/mole)

5.10. Hydrogénophosphate de disodium ($Na_2HPO_4.2H_2O$ pur à 98,5% - PM = 178,05 g/mole)

5.11. Eau distillée

5.12. Préparation enzymatique commerciale à analyser

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

6. Solutions

6.1. Tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,5

Il est constitué de 2 solutions, A et B.

6.1.1. Solution A : introduire 4,10 g d'acétate de sodium (5.3) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).

6.1.2. Solution B : introduire 2,8 mL d'acide acétique (5.4) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).

6.1.3. Préparation du tampon acétate de sodium : mélanger 39,2% de solution A (6.1.1) + 60,8% de solution B (6.1.2). Vérifier que le pH est égal à 4,5 à l'aide d'un pH mètre (4.10).

Conserver à 4°C

6.2. Solution de pectine d'agrume à 0,5% (p/v)

Introduire 0,5g de pectine d'agrume (5.1) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.1) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9). La solution doit être préparée extemporanément.

6.3. Solution d'acide acétique 0,05 M

Introduire 0,2835 mL d'acide acétique (5.4) dans 100 mL d'eau distillée (5.11), dans une fiole jaugée de 100 mL (4.8).

6.4. Solution d'acétate d'ammonium 2 M

Dissoudre 15,4 g d'acétate d'ammonium (5.6) dans 100 mL d'acide acétique (6.3), dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9).

6.5. Pentane-2,4-dione 0,02 M

Introduire 40,8 µl de pentane-2,4-dione (5.7) dans 20 mL de solution d'acétate d'ammonium (6.4).

La solution doit être préparée extemporanément.

6.6. Tampon phosphate de sodium (0,25 M ; pH 7,5)

Il est constitué des solutions A et B.

6.6.1. Solution A : introduire 34,015 g de dihydrogénophosphate de potassium (5.9) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

6.6.2. Solution B : introduire 44,5125 g de hydrogénophosphate de disodium (5.10) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).

6.6.3. Préparation du tampon phosphate de sodium : mélanger 16,25 % de solution A (6.6.1) + 83,75% de solution B (6.6.2) pour obtenir un pH de 7,5.

Vérifier le pH à l'aide d'un pH mètre (4.10).

Conserver à 4°C, une semaine maximum

6.7. Solution mère de méthanol à 40 □g/mL

Introduire 5 µL de méthanol (5.8) à l'aide d'une seringue de précision (4.14) dans 100 mL de tampon phosphate de sodium (6.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9).

6.8. Alcool oxydase à 1U/mL

Diluer l'alcool oxydase de *Pichia pastoris* (5.5) dans du tampon phosphate (6.6) afin d'obtenir une solution à 1U/mL. La solution doit être préparée extemporanément.

7. Préparation de la gamme étalon de méthanol

La gamme étalon est réalisée de 0 à 20 µg comme indiqué dans le tableau n°1. Elle est constituée de la solution mère de méthanol (6.7.)

Tableau 1 : gamme étalon de méthanol

Qté Méthanol (□g)	*0*	*5*	*10*	*15*	*20*
Qté Méthanol (□mole)	0	0,1563	0,3125	0,4688	0,625
Vol solution mère (6.7.) (□l)	0	75	150	225	300
Vol tampon (6.6.) (□l)	600	525	450	375	300

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 au moment de l'utilisation.

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

8.1. Solution enzymatique à 1 g/l à préparer extemporanément

Placer 100 mg de préparation commerciale (5.12) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9), compléter avec de l'eau distillée (5.11), agiter (4.19) afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2. Blanc dénaturé par chauffage à préparer extemporanément

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 1 g/l (8.1) dans un tube à vis de 15 mL (4.16) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.4). Puis refroidir et centrifuger pendant 5 min à 6 500 g.

9. Mode opératoire

9.1. Cinétique enzymatique :

Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 5 tubes à vis de 15 mL (4.16) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.17) dans un bain d'eau à 30°C, introduire

100 µL de la solution enzymatique à 1 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision (4.13),

500 µL de solution de pectine d'agrume (6.2) préalablement portée à 30°C dans le bain d'eau, enclencher le chronomètre (4.6)

Après agitation (4.18), les tubes sont replacés dans le bain d'eau à 30 °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
- 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 30°C, dans le bain d'eau à 100°C (4.4) durant 10 mn.

Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

Note : le point de cinétique à 10 min permet d'évaluer l'activité enzymatique recherchée.

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

9.2. Dosage du méthanol libéré

Dans un tube à vis de 15 mL (4.16) ajouter 1 mL de solution d'alcool oxydase (6.8) au milieu réactionnel (9.1), à l'aide de la seringue de précision (4.12), enclencher le chronomètre (4.6). Après agitation (4.18), le tube est placé dans le bain d'eau à 25°C (4.1) pendant 15 min.

Ajouter ensuite 2 mL de pentane-2,4-dione à 0,02 M (6.5) à l'aide de la seringue de précision (4.11) , enclencher le chronomètre (4.6).

Après agitation (4.18), le tube est placé dans le bain d'eau à 60°C (4.3) pendant 15 min.

Le tube est ensuite refroidi sous courant d'eau froide.

Placer le surnageant résultant dans une cuve (4.7).

Réaliser le zéro du spectrophotomètre avec de l'eau distillée.

Mesurer aussitôt l'absorbance à 412 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.15).

9.3. Blancs

Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 1 g/l (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). Pour chaque point de cinétique, la réaction enzymatique de chaque blanc est réalisée 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 méthanol de 0 à 20 µg (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 Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

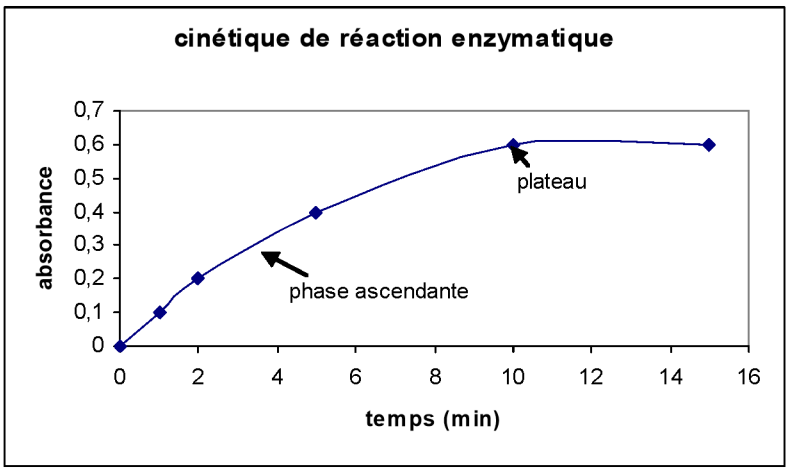


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 12 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 méthanol (de 0 à 0,625 µmole) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente 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 méthanol 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 :

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

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

Avec Q : quantité de méthanol libéré 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 1 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	0,14
R	0,112
Sr	0,05
SR	0,04

La répétabilité intralaboratoires 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 méthyl estérase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,05 avec un pourcentage d'erreur de 5,46. 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 intralaboratoires 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 :

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

- 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 ». Cette analyse de variance donne un écart type de reproductibilité de 0,04.
- 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 (**)
PME	Respectées	0,00001	99%	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%.

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

12. Références bibliographiques

1. KLAVONS J.A., BENNET R.D., Determination of methanol using alcohol oxydase and its application to methyl ester content of pectins. J. Agr. Food. Chem, 1986. Vol 34, p 597-599.
2. Activités enzymatiques et leurs mesures – OIV Document, FV 1226, 2005

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008