RÉSOLUTION OENO 10/2008

CODEX - POLYGALACTURONASE

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 :

POLYGALACTURONASE

activités endo et exo polygalacturonases (PG)

(EC 3.2.1.15 – CAS n° 9032-75-1)

Spécifications générales

Ces enzymes ne sont pas trouvées à l'état pur mais elles sont présentesnt 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 les activités Polygalacturonases :

- Pectine lyase
- Pectine méthyle estérase

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 hémicellulases (voir fiche « hémicellulase ») 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 puisqu'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 polygalacturonase du commerce (5.4). 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

Les polygalacturonases coupent les chaînes de pectines de faible degré de méthylation et libèrent ainsi les acides galacturoniques constitutifs de la pectine situés aux extrémités de la chaîne. Une fois libérées, les acides galacturoniques sont dosés par 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 250 ¤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 jaugée de 100 mL

4.7.1. Fiole jaugée de 500 mL

4.8. Seringue de précision 200 µL

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

© OIV 2008

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

4.12. Agitateur de type vortex

4.13. Flacon en verre brun de 500 mL.

4.14. Chambre à 4°C

4.15. Etuve 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, 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. Acide polygalacturonique pur à 85%. Il s'agit de "Polygalacturonic acid sodium salt" from citrus fruit (Sigma, P3850) à titre d'exemple.

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 ($CuSO_4.5H_2O$ 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). **Compte tenu de la toxicité de ce produit, une attention particulière doit être portée lors de sa manipulation. Les déchets doivent être traités de manière**

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

© OIV 2008

appropriée.

5.12. Acide D-galacturonique ($C_5H_{10}O_7.H_2O$ - PM : 212,16 g/mole)

5.13. Eau distillée

5.14. Préparation enzymatique commerciale à analyser

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 hydraté (5.8) dans 100 mL d'eau distillée (5.13) et ajouter une goutte d'acide sulfurique concentré (5.9). Conserver à 4°C.

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 molybdate d'ammonium

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

© OIV 2008

(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'arséniate 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 verre brun de 500 mL (4.13).

6.2. Tampon acétate de sodium (pH 4,2, 100 mM)

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 d'acide polygalacturonique à 0,4 % (p/v)

Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7) dissoudre 0,4 g d'acide polygalacturonique (5.3) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.2).

La solution doit être préparée extemporanément.

6.4. Solution mère d'acide D-galacturonique à 250 µg/mL

Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), dissoudre 0,0250 g d'acide D-galacturonique (5.12) dans de l'eau distillée (5.13) en complétant à 100 mL.

7. Préparation de la gamme étalon d'acide D-galacturonique

La gamme étalon est réalisée de 0 à 250 µg/mL, selon le tableau 1.

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

© OIV 2008

Tableau 1 : gamme étalon d'acide D-galacturonique

Acide galacturonique (µg/mL)	0	25	50	100	150	200	250
Acide galacturonique (µmole/mL)	0	0,118	0,236	0,471	0,707	0,943	1,178
Vol (µL) solution mère (6.4)	0	100	200	400	600	800	1000
Vol (µL) eau distillée (5.13)	1000	900	800	600	400	200	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 au moment de l'utilisation.

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

Placer 100 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 à préparer extemporanément

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 1 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). 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 de 15 mL (4.11) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.19) dans un bain d'eau à 40°C, introduire

- 200 µL de la solution enzymatique à 1 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8),

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

© OIV 2008

- 400 µL d'eau distillée (5.13), à l'aide de la seringue de précision (4.8.1),
- 600 µL d'acide polygalacturonique (6.3) préalablement portée à 40°C dans le bain d'eau, 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 replacés 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
- 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.
Note : le point de cinétique à 10 min permet d'évaluer l'activité enzymatique recherchée.

9.2. Dosage des substances réductrices libérées

Dans un tube de 15 mL (4.11)
placer 1 mL du milieu réactionnel (9.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8.3)
ajouter 1 mL de solution C (6.1.3), à l'aide de la seringue de précision (4.8.3),
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 (5.13) 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 2430 g durant 10 mn.
Placer le surnageant dans une cuve (4.20).
Réaliser le zéro du spectrophotomètre avec de l'eau distillée.Mesurer aussitôt l'absorbance à 520 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.10).

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

© OIV 2008

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 d'acide D-galacturonique de 0 à 250 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).

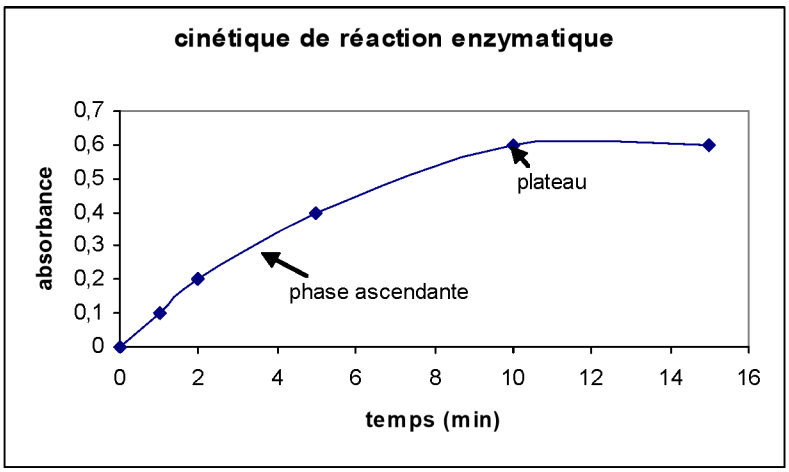


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

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.

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

© OIV 2008

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 d'acide D-galacturonique (de 0 à 0,589 µmole/mL) 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 d'acide D-galacturonique 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 d'acide D-galacturonique 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 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

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

© OIV 2008

r	0,084
R	0,056
Sr	0,03
SR	0,02

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 polygalacturonase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,03 avec un pourcentage d'erreur de 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 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 :

- 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 0,02.
- 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.

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

© OIV 2008

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 (**)
PG	Interaction traitement*blocs	0,0256	77%	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%.

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. 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