

RESOLUTION OENO 15/2001

LYSOZYME

L'ASSEMBLEE GENERALE,

VU l'Article 5, alinéa 4 de la Convention internationale d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins du 13 octobre 1954,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DECIDE d'introduire dans le Codex œnologique international, la monographie suivante dans ledit Codex : « **Lysozyme** »

Lysozyme

Muramidase

N° SIN :1105 (enzyme 3.2.1.17)

1. Objet, origine et domaine d'application

Le lysozyme (Chlorhydrate de Lysozyme) est extrait du blanc d'œuf comestible de poule. Il est employé en tant qu'inhibiteur de croissance des bactéries. Il peut être utilisé dans les moûts et les vins. Sa dose d'emploi est limitée.

Le lysozyme ne contient ni substances, ni micro-organismes ni activités enzymatiques collatérales qui peuvent :

- être nuisibles à la santé,
- être nuisibles à la qualité des produits traités,
- conduire à la formation de produits indésirables, ou favoriser des interventions de fraudes.

2. Etiquetage

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, ainsi que les conditions de sécurité, de conservation et la date limite d'utilisation.

3. Composition

C'est un polypeptide naturel constitué par 129 aminoacides dont 21 acides aspartiques, 5 acides glutamiques, 12 alanines, 11 arginines, 8 cystéines, 3 phénylalanines, 12 glycines, 6 isoleucines, 1 histidine, 8 leucines, 6 lysines, 2 prolines, 2 méthionines, 10 sérines, 3 tyrosines, 7 thréonines, 6 tryptophanes et 6 valines.

Il a une masse moléculaire de 14.700 Daltons.

Sa teneur en eau doit être inférieure ou égale à 6 %.

4. Caracteres

Il se présente sous forme de poudre cristalline, blanche, inodore, d'une saveur douceâtre.

5. Solubilité

Le lysozyme est soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques.

6. Caracteres d'identité

Une solution aqueuse à 2 % doit présenter un pH compris entre 3,0 et 3,6.

Une solution aqueuse contenant 25 mg/100 ml présente un maximum d'absorption à 281 nm et un minimum à 252 nm.

7. Activité enzymatique

Son activité enzymatique est capable d'hydrolyser la liaison β -(1-4) entre l'acide N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine des parois cellulaires des bactéries Gram-positifs.

La concentration minimale du lysozyme est égale à 95 %. Il n'y a pas d'activité enzymatique secondaire.

8. Source de l'enzyme et moyen de production

L'enzyme est extrait du blanc d'œuf comestible de poule par un procédé de séparation sur résine échangeuse d'ions.

La pureté microbiologique garantit la sécurité pour son utilisation dans le domaine alimentaire. Le blanc d'œuf utilisé pour la préparation de l'enzyme est compatible avec

les paramètres établis par les organismes de contrôle et est traité en conformité avec les pratiques d'hygiène de fabrication.

9. Supports diluants, agents de conservation et additifs.

Il n'y a pas d'agent de conservation car la forme cristalline assure la stabilité.

10. Essais

10.1. Cendres sulfuriques

Déterminé comme il est indiqué en annexe, le taux de cendres sulfuriques du lysozyme ne doit pas être supérieur à 1,5 p. 100.

10.2. Azote total

Déterminé selon la méthode décrite en annexe, le taux d'azote total doit être compris entre 16,8 et 17,8% sur matière sèche.

10.3. Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 5 g de lysozyme dans 100 ml d'eau.

10.4. Métaux lourds

A 10 ml de solution préparée pour essais (10.3), ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R), 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Aucun précipité ne doit se produire. Si une coloration brune apparaît, elle doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en métaux lourds exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

10.5. Arsenic

Sur 2 ml de solution préparée pour essais (10.3), rechercher l'arsenic par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 1 mg/kg).

10.6. Plomb

A partir de la solution préparée pour essais (10.3) doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

10.7. Mercure

A partir de la solution préparée pour essais (10.3) doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

10.8. Contaminants biologiques

Détermination effectuée selon la méthode décrite en annexe.

Bactéries totales	inférieur à 10^3 UFC par g de préparation
Coliformes	max. 10 par g de préparation
<i>Escherichia coli</i>	absence vérifiée sur un échantillon de 1 g
<i>St. aureus</i>	absence vérifiée sur un échantillon de 1 g
Salmonelles	absence vérifiée sur un échantillon de 25 g
Levures	teneur limite 10^2 UFC par g de préparation
Bactéries lactiques totales	teneur limite : absence contrôlée sur un échantillon de 10 g de préparation
Bactéries acétiques	teneur limite 10^2 UFC par g de préparation
Moisissures	teneur limite 10^2 UFC par g de préparation.

11. Détermination de l'activité du lysozyme dans le vin (Détermination turbidimétrique)

11.1. Principe.

Le procédé analytique est celui établi par FIP (1997), avec des modifications apportées par FORDRAS. La méthode est fondée sur les changements de la turbidité d'une suspension de *Micrococcus luteus* ATCC 4698 induits par l'action lytique du lysozyme. Dans des conditions normales d'expérimentation, les changements mentionnés ci-dessus sont proportionnels à la quantité de lysozyme dans le milieu.

11.2. Substrat

Suspendre une certaine quantité (40 – 60 mg) de *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (Boehringer) en poudre dans quelques ml de solution tampon phosphatée M/15 pH 6,6 ($\approx$ 0,1), pour obtenir une suspension homogène et compléter à 100 ml avec le même tampon (utiliser l'agitation manuelle ou un bain ultrasonique; ne pas utiliser un agitateur électromagnétique).

La quantité exacte de *Micrococcus luteus* à prélever dépend du type de spectrophotomètre utilisé.

Préparer un contrôle avec 5 ml de tampon et 5 ml de suspension de *Micrococcus luteus* et mesurer l'absorbance de cette suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm contre une solution de contrôle de tampon phosphaté. L'absorbance ne doit pas être inférieure à 0,800.

Si la lecture ne correspond pas, il faut adapter la teneur de *Micrococcus luteus* dans la suspension et mesurer l'absorbance désirée.

N.B.: Avec un spectrophotomètre sensible, les valeurs d'absorbance de la solution donnée ci-dessus sont 0,800 – 0,900. Des appareils moins sensibles donnent une absorbance inférieure avec cette même suspension (0,500 – 0,600).

Dans ce cas on ne doit pas augmenter la quantité du substrat pour obtenir les valeurs initiales d'absorbance de 0,800 – 0,900, car la reproductibilité et la linéarité du dosage ne sont pas fiables.

11.3. Préparation de la solution standard

11.3.1. Dissoudre dans de l'eau environ 50 mg de chlorhydrate de lysozyme pesés exactement, et compléter à 100 ml dans une fiole jaugée.

11.3.2. Diluer 5 ml de la solution 11.3.1 avec de l'eau jusqu'à 50 ml.

11.3.3. Diluer 2 ml de cette solution avec un tampon phosphate M/15 jusqu'à 100 ml pour obtenir une solution à 1 mg/l de lysozyme (**solution standard**).

11.4. Solution à analyser

En relation avec la concentration supposée du lysozyme, diluer l'échantillon de vin avec le tampon phosphate M/15 dans le but d'obtenir la même concentration que la solution standard (1 mg/l).

11.5. Procédé

Préparer les solutions suivantes dans des tubes à essai de 180 $\times$ 80 mm.

Solution standard et à analyser	Tampon M/15	Concentration en lysozyme
2,0 ml	3,0 ml	0,4 mg/l
2,8 ml	2,2 ml	0,56 mg/l
4,0 ml	1,0 ml	0,8 mg/l

Il est conseillé de répéter chaque dilution trois fois pour la solution standard ainsi que celle à analyser.

Préparer deux tubes à essai avec 5 ml de tampon comme témoin de la suspension de *Micrococcus luteus*. Utiliser le premier tube témoin au début et le deuxième à la fin de l'essai.

Au bout de 30 secondes exactement, ajouter dans chaque tube à essai 5 ml de suspension de *Micrococcus luteus*, qui doit être maintenue manuellement agitée pour éviter la décantation. Agiter au Vortex les tubes et les tremper exactement 12 minutes dans un bain d'eau à 37°C (± 5°C).

Les quantités finales de lysozyme contenues dans les tubes seront 0,2 – 0,28 – 0,4 mg/l.

Après incubation, prélever à 30 secondes d'intervalle les tubes dans le même ordre d'ajout au bain d'eau.

Agiter et lire l'absorbance au moyen d'un spectrophotomètre à 540 nm pour le vin blanc et à 740 nm pour le vin rouge contre un témoin de tampon.

Normalement, l'essai est acceptable quand la différence entre les valeurs d'absorbance des deux tubes à essai témoins, est inférieure à 5%.

11.6. Calcul

Avec les valeurs obtenues, on prépare une courbe standard, indiquant en ordonnée les valeurs moyennes d'absorbance pour chaque concentration de la solution standard et en abscisse les concentrations en lysozyme sur une échelle logarithmique.

Reporter les résultats obtenus pour les dilutions de la solution à analyser.

Tirer deux lignes droites : une entre les points obtenus pour la solution standard et l'autre entre les points de la solution à analyser. Les deux lignes doivent être parallèles, sinon le dosage est incorrect.

Tracer ensuite une ligne parallèle à l'axe des abscisses de façon à couper les deux lignes droites environ à la moitié de la limite extrême du dosage.

Aux deux points d'intersection, correspondent deux concentrations sur l'abscisse (C_{st} concentration de la courbe standard - C_x concentration de la courbe de la solution à analyser).

Calculer l'activité comme suit :

$$\text{Concentration du lysozyme } (\mu\text{g/ml}) = \frac{C_{st} \times D}{C_x}$$

où

C_{st} = concentration de la solution standard

C_x = concentration de la solution à analyser

D = facteur de dilution

12. Détermination du lysozyme dans le vin (Détermination par HPLC)

Le lysozyme résiduel peut être dosé par HPLC selon la méthode figurant au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

13. Conservation

Le lysozyme doit être conservé à température normale en récipient fermé hermétiquement et à l'abri de l'humidité.

14. BIBLIOGRAPHIE

1. FIP (1997), Pharmaceutical Enzymes, A.Lowers et S.Scharpe ed. 1997, vol. 84 pages 375/379.