RÉSOLUTION OIV-OENO 573-2018

DETERMINATION D'UNE ACTIVITE HEMICELLULASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'Accord portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition du groupe d'experts Spécifications des produits œnologiques,

DECIDE d'introduire dans le chapitre 1 du Codex Œnologique International la fiche COEI-1-XYLANA:

Détermination de l'activité endo-1,4-β-xylanase dans les préparations enzymatiques

(EC 3.2.1.8 ; N°CAS : 9025-57-4)

Spécifications générales

Les hémicellulases sont généralement présentes dans les préparations enzymatiques parmi d'autres activités au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OIV/OENO 365/2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques qui figure dans le Codex Œnologique International.

1. Origine et application

Les hémicellulases catalysent la dégradation des hémicelluloses. Les hémicelluloses des parois des cellules de la baie de raisin sont principalement composées de xyloglucanes et d'arabinoxylanes ; ces deux polysaccharides représentent près de 90% des hémicelluloses du raisin.

L'activité hémicellulase des préparations enzymatiques est évaluée par la mesure de l'activité 1,4 -β -xylanase.

Les préparations enzymatiques renfermant des activités hémicellulases, sont utilisées lors de la macération du raisin, la clarification des moûts et des vins ainsi que pour

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

améliorer leur filtrabilité.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées, par exemple, d'Aspergillus sp. ou de Trichoderma sp., ou des mélanges d'enzymes ainsi obtenus.

2. Domaine d'application

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

3. Principe

Les xylanases hydrolysent les chaînes de xylanes et libèrent ainsi les extrémités réductrices des oses constitutifs. La mesure de l'activité xylanase est estimée en mesurant les oses réducteurs (xylose) libérés lors de la période d'incubation, selon la méthode de Nelson (1944). 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 μg/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. fiole cylindrique de 100 mL

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

4.6. chronomètre

4.7. fioles jaugées de 100 mL

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

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 1/10e 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. 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)

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

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

5.3. xylane (Beechwood) P-XYLNBE-10G Lot N°171004a Megazyme

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 (KNa$C_4H_4O_6.4H_2O$ 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-xylose ($C_5H_{10}O_5$ pur à 99% - PM = 150 g/mole)

5.13. eau distillée

5.14. préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

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.

6.2. 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 et mélanger (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.

6.2.1. 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).

6.2.2. 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).

6.2.3. 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 Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

verre brun de 500 mL (4.13).

6.3. Tampon acétate de sodium (pH 4,2, 100 mmol/L)

Il est constitué des solutions A et B.

6.3.1. 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)

6.3.2. Solution B (acide acétique 0,1 M) : étendre 1 mL d'acide acétique (5.2) par 175 mL d'eau distillée (5.13)

6.3.3. 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).

6.4. Solution de xylane d'avoine à 2% (p/v)

Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7) dissoudre 1 g de xylane d'avoine (5.3) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.2).

6.5. Solution mère de Xylose à 400µg/mL

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

7. Préparation de la gamme étalon de xylose

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

Tableau 1 : gamme étalon de xylose

Xylose (µg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	400
Xylose (µmole/mL)	0	0,232	0,462	0,694	0,925	1,156	1,387	1,890
Vol solution mère (µL) (6.4.)	0	125	250	375	500	625	750	1000

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

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 enzymatique (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 min 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 de 200 µL (4.8)

Introduire 400 µL de tampon acétate de sodium (6.2), à l'aide de la seringue de précision de 1 mL (4.8.1),

Et 600 µL de xylane d'avoine à 2% (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 Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

- durant 10 mn pour le tube n°4
- durant 20 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 min.
Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

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

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 min.

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 min.
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 xylose de 0 à 400 µg/mL (7).

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

10. Calcul

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).

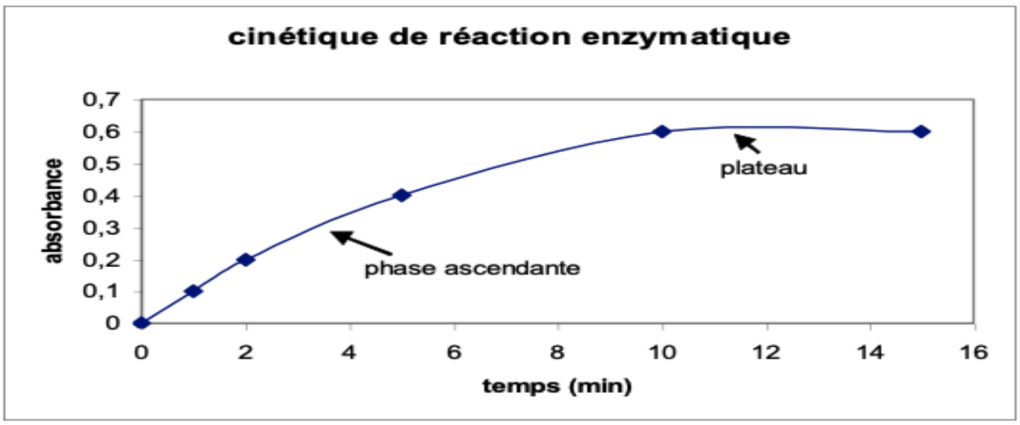

Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 15 min 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 xylose (de 0 à 1,89 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)

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

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 min pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q de xylose libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).
L'activité enzymatique en U/g de préparation est calculée par la formule suivante :

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

Avec

- Q : quantité de xylose 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

L'activité catalytique en nanokatal :

$$\boxed{Activité\ en\ nkat/g = (activité\ en\ U/g) \times (1000/60)}$$

Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde.

11. Caractéristiques de la méthode

- r= 0.056
- R= 0.056
- S_r= 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 xylanase la moyenne des écarts-

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

types des valeurs est de 0,02 avec un pourcentage d'erreur de 9,7%. 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 α 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 (**)**
Xylanase	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

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

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 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 2018

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND