

RÉSOLUTION OIV-OENO 363-2012

DETERMINATION DE L'ACTIVITE PECTINE METHYL ESTERASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES (COMPLEMENT A LA RESOLUTION OENO 9/2008)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

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,

CONSIDÉRANT les travaux du groupe d'experts Spécifications des produits œnologiques,

CONSIDÉRANT la résolution OENO 9/2008 adoptée en 2008 concernant la pectine méthyl estérase

DÉCIDE de modifier le titre de la résolution 9/2008 qui devient « Détermination de l'activité pectine méthyl estérase dans les préparations d'enzymes » et de compléter la monographie sur la détermination de l'activité pectine méthyl estérase (Oeno 9/2008) publiée dans le Codex œnologique international, par la modification suivante :

DÉCIDE d'ajouter un titre à la méthode déjà existante, indiquant « Détermination de l'activité pectine méthyl estérase par dosage du méthanol » et de renuméroter les points concernés

Détermination de l'activité pectine méthyl estérase dans les préparations d'enzymes

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes au sein d'une préparation enzymatique complexe. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365-2009 relative aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques figurant dans le Codex œnologique international.

1. Origine

On se reportera au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations

dirigées, comme par exemple, d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus oryzae*, d'*Aspergillus sojae*, *Aspergillus Tubigensis*, *Aspergillus Awamori*, de *Rhizopus oryzae* et de *Trichoderma longibrachiatum* (*T. reesei*)

2. Objet / Applications

On se reportera au Code international des pratiques œnologiques, OENO 11/04 ; 12/04 ; 13/04 ; 14/04 et 15/04.

Ces activités d'enzymes sont utilisées pour faciliter la macération du raisin et l'extraction du jus de raisin et pour aider à la clarification des moûts et des vins et enfin pour améliorer leur filtrabilité.

Détermination de l'activité pectine méthyl estérase par titrage acide-base

1. Principe

L'activité de déméthylation de la pectine méthyl estérase a pour conséquence l'apparition de groupes carboxyliques libres au niveau des acides galacturoniques constituant les chaînes. Pour déterminer l'activité pectine méthyl estérase, les groupes carboxyliques peuvent être titrés au cours de l'hydrolyse enzymatique avec une solution d'hydroxyde de sodium à température constante et valeur pH constante.

2. Équipement et matériel

- équipement de titrage (burette)
- plaque chauffante à régulation thermique et agitateur magnétique / barreau magnétique
- pH-mètre
- coupelle en verre, remplie d'eau
- chronomètre
- fioles jaugées (de différents volumes)
- béchers (de préférence 50 mL)

- pipettes de précision (de différents volumes)
- agitateur vortex

3. Produits chimiques et réactifs

- Pectine hautement estérifiée ; qualité p.a. (Sigma P9135-100G) ; CAS 9000-69-
- Solution NaOH 0,01 M (Titrisol) qualité p.a. ; CAS 1310-73-2
- Pastilles de NaOH qualité p.a. ; CAS:1310-73-2

4. Préparation des solutions

4.1. NaOH 1 M

Dissoudre 4 g de NaOH dans 100 mL de H_2O

4.2. Solution substrat

Une solution substrat à 1 % de pectine dans H_2O est préparée par dissolution très lente de 2,0 g de pectine dans 150 mL de H_2O . Par la suite on ajuste la valeur du pH à pH 4,0 à 40 °C avec du NaOH 1 M. Il faut compléter la solution jusqu'à 200 mL précisément. Juste avant la mesure il faut à nouveau contrôler la valeur du pH et la corriger à pH 4,0 si nécessaire

4.3. Solution enzymatique

La solution enzymatique est composée à partir d'une préparation enzymatique disponible dans le commerce d'environ 30 à 50 mg/L, qui est diluée dans l'eau froide. Cette solution doit être préparée juste avant utilisation.

4.4. NaOH 0,01M

Cette solution prête à l'emploi doit être diluée conformément aux instructions du producteur.

5. Détermination de l'activité enzymatique

Verser 20 mL de solution substrat dans un bécher (agitateur magnétique en place)

déposé sur la plaque chauffante à régulation thermique dans une coupelle en verre, laquelle est remplie d'eau chauffée à 40 °C. Introduire l'électrode de mesure du pH dans la solution substrat. Il est nécessaire de contrôler, et éventuellement d'ajuster de nouveau la valeur du pH à 40°C avant de commencer l'analyse. Ajouter ensuite 0,1 mL de la solution enzymatique. Démarrer le chronomètre à ce moment précis. La valeur du pH doit être mesurée pendant l'analyse et l'échantillon doit être titré jusqu'au pH 4,0 avec NaOH 0,01 M pendant 10 minutes à 40 °C. Arrêter l'analyse après 10 minutes et relever la consommation de NaOH 0,01 M.

La consommation de NaOH 0,01 M devrait être de l'ordre de 3,5 mL à 8,5 mL. Dans le cas contraire, il est recommandé de diluer ou de concentrer la solution enzymatique.

6. Calcul de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité (U/mg)} = n / (t \cdot v \cdot c)$$

$$\text{Activité (nkat/g)} = (\text{Activité (U/g)} \cdot 1000/60) \cdot 1000$$

n = consommation de NaOH 0,01 M en μmol

t = temps en minutes (dans ce cas 10 minutes)

v = quantité de solution enzymatique utilisée en mL (= 0,1 mL)

c = concentration de la solution enzymatique en g/L

Validation du titrage acide-base pour déterminer l'activité pectine méthyl estérase

La valeur moyenne de l'écart type a été déterminée pour 8 enzymes différentes.

Chaque enzyme a été analysée 6 fois.

Valeur moyenne de l'écart type des différentes enzymes : 3,91%

	Enzyme 1 40 mg/mL	Enzyme 2 40 mg/mL	Enzyme 3 40 mg/mL	Enzyme 4 40 mg/mL	Enzyme 5 40 mg/mL	Enzyme 6 40 mg/mL	Enzyme 7 30 mg/mL	Enzyme 8 50 mg/mL	Enzyme 8 30 mg/mL
Valeur moyenne (nkat/g)	14527,7	19291,7	12756,8	9534,7	9444,5	18577,8	31591,7	10888,9	9446,5
Écart type (nkat/g)	282,3	449,5	366,4	227,4	272,3	145,6	540,9	944,4	1096,1

Écart type %	1,9	2,3	2,9	2,4	2,9	0,8	1,7	8,7	11,6
$s^2(r)$	66410	168402	111863	43097	61786	17654	243773	743210	1001244
s (r)	257,7	410,4	334,5	207,6	248,6	132,9	493,7	862,1	1000,6
Répétabilité r (nkat/g)	729,3	1161,3	946,5	581,5	703,4	376,0	1397,3	2439,7	2831,8

Validation du titrage acide-base pour déterminer l'activité pectine méthyl estérase

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g	Enzyme 1 40 mg/mL		$(X-MW)^2$
Enzyme 1	40 mg/mL	0,89	14833	valeur moyenne (nkat/g)	14527,7	93228,4
Enzyme 1	40 mg/mL	0,89	14750	écart type (nkat/g)	282,30	49432,1
Enzyme 1	40 mg/mL	0,88	14667	écart type %	1,9	19413,8
Enzyme 1	40 mg/mL	0,85	14083	variance	3,8	197728,4
Enzyme 1	40 mg/mL	0,87	14500	$s^2(r)$	66410,6	765,4
Enzyme 1	40 mg/mL	0,86	14333	s(r)	257,7	37895,1
				r (nkat/g) répétabilité	729,3	total 398463,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g	Enzyme 2 40 mg/mL	$(X-MW)^2$
--------	---------------	------	--------	-------------------	------------

Enzyme 2	40 mg/mL	1,185	19750	valeur moyenne (nkat/g)	19291,7	210069,4	
Enzyme 2	40 mg/mL	1,155	19250	écart type (nkat/g)	449,54	1736,1	
Enzyme 2	40 mg/mL	1,130	18833	écart type %	2,3	210069,4	
Enzyme 2	40 mg/mL	1,125	18750	s ² (r)	168402,8	293402,8	
Enzyme 2	40 mg/mL	1,190	19833	s(r)	410,4	293402,8	
Enzyme 2	40 mg/mL	1,160	19333	r (nkat/g) répétabilité	1161,3	1736,1	
						total	1010416,7

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g	Enzyme 3 40 mg/mL		(X-MW) ²
Enzyme 3	40 mg/mL	0,78	13042	valeur moyenne (nkat/g)	12756,8	81320,0
Enzyme 3	40 mg/mL	0,79	13208	écart type (nkat/g)	366,38	203551,4
Enzyme 3	40 mg/mL	0,76	12708	écart type %	2,9	2384,7
Enzyme 3	40 mg/mL	0,76	12583	s ² (r)	111863,1	30218,0
Enzyme 3	40 mg/mL	0,77	12833	s(r)	334,5	5801,4
Enzyme 3	40 mg/mL	0,73	12167	r (nkat/g) répétabilité	946,5	347903,4

total	671178,8
-------	----------

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 4	40 mg/mL	0,57	9500
Enzyme 4	40 mg/mL	0,59	9875
Enzyme 4	40 mg/mL	0,56	9333
Enzyme 4	40 mg/mL	0,56	9250
Enzyme 4	40 mg/mL	0,58	9583
Enzyme 4	40 mg/mL	0,58	9667

Enzyme 4 40 mg/mL		(X-MW) ²
valeur moyenne (nkat/g)	9534,67	1201,8
écart type (nkat/g)	227,41	115826,8
écart type %	2,4	40669,4
s ² (r)	43096,9	81035,1
s(r)	207,6	2336,1
r (nkat/g) répétabilité	587,5	17512,1
total		258581,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 5	40 mg/mL	0,55	9167
Enzyme 5	40 mg/mL	0,59	9792
Enzyme 5	40 mg/mL	0,55	9083
Enzyme 5	40 mg/mL	0,57	9458

Enzyme 5 40 mg/mL		(X-MW) ²
valeur moyenne (nkat/g)	9444,5	77006,3
écart type (nkat/g)	272,29	120756,3
écart type %	2,9	130682,3
s ² (r)	61785,6	182,3

Enzyme 5	40 mg/mL	0,57	9542	s(r)	248,6	9506,3	
Enzyme 5	40 mg/mL	0,58	9625	r (nkat/g) répétabilité	703,4	32580,3	
						total	370713,5

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g	Enzyme 6 40 mg/mL		(X-MW) ²	
Enzyme 6	40 mg/mL	1,105	18417	valeur moyenne (nkat/g)	18577,8	25956,8	
Enzyme 6	40 mg/mL	1,118	18633	écart type (nkat/g)	145,55	3086,4	
Enzyme 6	40 mg/mL	1,125	18750	écart type %	0,8	29660,5	
Enzyme 6	40 mg/mL	1,105	18417	s ² (r)	17654,3	25956,8	
Enzyme 6	40 mg/mL	1,112	18533	s(r)	132,9	1975,3	
Enzyme 6	40 mg/mL	1,123	18717	r (nkat/g) répétabilité	376,0	19290,1	
						total	105925,9

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g	Enzyme 7 30 mg/mL		(X-MW) ²
Enzyme 7	30 mg/mL	1,920	32000	valeur moyenne (nkat/g)	31591,7	166736,1
Enzyme 7	30 mg/mL	1,947	32450	écart type (nkat/g)	540,86	736736,1

Enzyme 7	30 mg/mL	1,873	31217	écart type %	1,7	140625,0	
Enzyme 7	30 mg/mL	1,860	31000	s ² (r)	243773,1	350069,4	
Enzyme 7	30 mg/mL	1,893	31550	s(r)	493,7	1736,1	
Enzyme 7	30 mg/mL	1,880	31333	r (nkat/g) répétabilité	1397,3	66736,1	
						total	1462638,9

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g	Enzyme 8 50 mg/mL		(X-MW) ²	
Enzyme 8	50 mg/mL	0,578	9633	valeur moyenne (nkat/g)	10888,9	1576419,8	
Enzyme 8	50 mg/mL	0,682	11367	écart type (nkat/g)	944,38	228271,6	
Enzyme 8	50 mg/mL	0,706	11767	écart type %	8,7	770493,8	
Enzyme 8	50 mg/mL	0,712	11867	s ² (r)	743209,9	956049,4	
Enzyme 8	50 mg/mL	0,596	9933	s(r)	862,1	913086,4	
Enzyme 8	50 mg/mL	0,646	10767	r (nkat/g) répétabilité	2439,7	14938,3	
						total	4459259,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g	Enzyme 8 30 mg/mL	(X-MW) ²
--------	---------------	------	--------	-------------------	---------------------

Enzyme 8	30 mg/mL	0,69	11444	valeur moyenne (nkat/g)	9446,5	3990006,3	
Enzyme 8	30 mg/mL	0,067	8667	écart type (nkat/g)	1096,13	607620,3	
Enzyme 8	30 mg/mL	0,063	8889	écart type %	11,6	310806,3	
Enzyme 8	30 mg/mL	0,065	8429	s ² (r)	1001243,9	1035306,3	
Enzyme 8	30 mg/mL	0,07	9625	s(r)	1000,6	31862,3	
Enzyme 8	30 mg/mL	0,067	9625	r (nkat/g) répétabilité	2831,8	31862,3	
						total	6007463,5

valeur moyenne des écarts types en %	3,91
---	-------------