

RÉSOLUTION OIV/OENO 351/2009

DERMINATION DE LA CAPACITE D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE A COUPER LES CHAINES PECTIQUES PAR LA MESURE DE LA VISCOSITE

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 « Méthodes d'analyse » et du groupe d'experts « Spécification des produits œnologiques »,

DECIDE, sur proposition de la commission II « Œnologie », de compléter le Chapitre II du Codex œnologique international par les techniques analytiques et de contrôle suivantes :

Détermination de la capacité d'une preparation enzymatique à couper les chaînes pectiques par la mesure de la viscosité

1. Principe

On se propose ici de mesurer la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire de moitié la viscosité d'une solution standard, dans des conditions déterminées de pH, de température et de temps.

C'est une mesure purement technologique destinée à tester l'efficacité clarifiante réelle de l'enzyme. Elle rend compte essentiellement de l'activité "pectinase" qui ne peut pas être déduite directement de la libération de l'acide galacturonique dans le milieu.

Remarque

Pour mesurer l'activité de l'enzyme, deux approches peuvent être réalisées :

- Soit le temps que met une concentration donnée d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié,
- Soit la concentration nécessaire d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié dans un temps donné.

Des tests montrent que, tant que le substrat n'est pas limitant :

- Dans le premier cas, le logarithme de la viscosité (temps d'écoulement) est inversement proportionnel au temps de réaction et,
- Dans le deuxième cas, le logarithme de la viscosité est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme dans le milieu.

Dans un cas comme dans l'autre, il est facile de trouver, soit le temps, soit la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire la viscosité de moitié à partir d'une gamme judicieusement choisie.

2. Conditions réactionnelles

Milieu tampon phosphate 70 mmol/l et citrate 30 mmol/l

Substrat : Pectine de pomme estérifiée à 70-75% (par ex : Sigma P 8471), diluée à 10 g/l dans le tampon.

pH = 3,5

Température : 30 °C

Temps de réaction : 15 minutes.

Pectinase: gamme de concentrations encadrant environ 10 mg/l de poids sec d'enzyme dans l'échantillon soit par exemple 0,5 mg dans 50 ml de substrat. Ceci correspondant à la quantité d'enzyme susceptible de faire diminuer la viscosité du substrat de moitié en 15 minutes dans les conditions décrites ci-dessus.

3. Appareillage

3.1. Thermostat à bain ou à circulation d'eau à 30 °C $\pm$ 1 °C

3.2. Viscosimètre à écoulement (A.3.1 :Fig. 2) ayant une valeur d'eau - c'est-à-dire le temps d'écoulement de l'eau entre les deux repères - de 18 à 20 secondes environ (soit un capillaire de diamètre de 0,5 à 0,6 mm environ)

3.3. Chronomètre

3.4. Balances analytiques (sensibilité 0.001g).

3.5. pH-mètre.

3.6. Agitateur magnétique, verrerie traditionnelle de laboratoire.

3.7. Filtres rapides en papier.

3.8. Micropipettes ou microseringues permettant de délivrer des volumes de 5 à 500

µl.

4. Produits purs

- 4.1. Acide citrique pur (99.5%)
- 4.2. Hydrogénophosphate de sodium dihydrate pur ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (99.0%)
- 4.3. Pectine de pomme estérifiée à 70–75% de pureté supérieure à 90 % (par ex : Sigma P 8471),
- 4.4. Eau distillée ou désionisée
- 4.5. Hydroxyde de sodium pur (98%)
- 4.6. Acide chlorhydrique pur (11,5 M) (33.5%)
- 4.7. Pectinase dont il faut mesurer l'activité.

5. Solutions

Chaque solution doit être homogénéisée avant l'utilisation

5.1. Hydroxyde de sodium 2M

Peser 80 g d'hydroxyde de sodium pur (4.5) dans une fiole jaugée de 100 ml dissoudre dans de l'eau désionisée (4.4) ajuster au trait de jauge après dissolution complète et refroidissement.

5.2. Acide chlorhydrique 2 M

Dans une fiole jaugée de 100 ml à moitié remplie d'eau désionisée placer la quantité suffisante d'acide chlorhydrique pur (4.6) pour obtenir une solution finale 2M, (après avoir complété jusqu'au trait de jauge).

5.3. Tampon phosphate 47 mmol/l, citrate 53 mmol/l, pH 3,5

5.3.1. Placer 800 ml d'eau désionisée (4.4) dans un ballon jaugé de 1000 ml

5.3.2. peser 11,22 g d'acide citrique (4.1)

5.3.3. peser 8,30 g de hydrogénophosphate de sodium dihydrate pur ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (4.2)

5.3.4. transférer les produits chimiques pesés quantitativement dans le ballon jaugé de 1000 ml tout en remuant

5.3.5. mélanger jusqu'à entière dissolution

5.3.6. ajuster le pH à $3,50 \pm 0,05$, à la température ambiante, avec de l'hydroxyde de sodium 2 M (5.1), ou l'acide chlorhydrique 2 M (5.2) selon le pH initial

5.3.7. ajuster au trait de jauge par l'eau désionisée (4.4). Mélanger

Stabilité : 8 jours à la température ambiante.

5.4. Substrat : Pectine de pomme (4.3),

5.4.1. Placer un récipient cylindrique de 400 ml dans un bain d'eau thermostatée à $40^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ sur un agitateur rotatif

5.4.2. ajouter 250 ml de tampon à pH 3,5 (5.3), exactement mesuré, dans le récipient cylindrique

5.4.3. maintenir une agitation douce à 40°C

5.4.4. peser $2,500 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de pectine (4.3)

5.4.5. ajouter lentement la pectine sous forte agitation

5.4.6. puis agiter lentement pendant 60 minutes en maintenant la température à 40°C

5.4.7. arrêter de remuer et refroidir à $30^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

5.4.8. filtrer sur papier filtre rapide (3.8) si nécessaire (présence de grumeaux)

Stabilité : 24 heures à la température ambiante.

5.5. Solution de pectinase à 100 g/l de poids sec (4.7)

5.5.1. peser $2,50 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de pectinase en poudre ou granulés

5.5.2. transférer dans un ballon jaugé de 25 ml

5.5.3. ajuster au trait de jauge par le tampon à pH 3,5 (5.3)

5.5.4. dissoudre par agitation pendant 20 minutes sur un agitateur magnétique

Filtrer sur papier filtre rapide si l'enzyme est immobilisée sur un matériau insoluble à l'aide d'un filtre rapide (3.7)

5.5.5. Dans le cas de préparation enzymatique liquide, utiliser directement celle-ci.

Stabilité : 4 heures à la température ambiante.

6. Mesures

6.1. Placer le viscosimètre dans le bain d'eau à 30°C ou utiliser tout dispositif permettant de faire la mesure de viscosité à 30°C

6.2. Mesurer la viscosité (en fait le temps d'écoulement entre les deux traits du viscosimètre) de la solution tampon à pH 3,5, soit t_0 . Ce temps doit être proche de 20 secondes pour un capillaire de 0,5 à 0,6 mm de diamètre.

6.3. Mesurer le temps d'écoulement de la solution de pectine à 10 g/l soit T_p , ce temps doit être de l'ordre de 200 secondes ou plus.

6.4. Préparer une série de 4 ballons jaugés contenant 50 ml de pectine à 10 g/l, les placer dans le bain d'eau à 30°C .

6.5. Ajouter dans le premier ballon, 5µl de la solution d'enzyme à 100 g/l, homogénéiser.

Puis toutes les 15 minutes environ rajouter successivement dans les autres fioles :

15 µl, 35 µl et enfin 100 µl de la solution d'enzyme à 100 g/l, homogénéiser.

6.6. Chronométrer le temps d'écoulement des différentes solutions entre les deux traits du viscosimètre exactement 15 minutes après l'ajout d'enzyme.

7. Représentation graphique des valeurs mesurées

Retrancher du temps d'écoulement la valeur t_0 correspondant au tampon à pH 3,5 seul.

Etablir le graphique représentant le logarithme temps d'écoulement en fonction de la concentration de l'enzyme.

Il doit exister au moins trois points alignés correspondant aux dilutions les plus fortes. Si ce n'est pas le cas, utiliser une solution d'enzyme plus diluée par exemple à 50 g/l ou même 10 g/l.

8. Interprétation des résultats

Rechercher l'équation de la droite de régression passant par les trois points alignés :

$$T = a.x + b$$

En déduire la concentration nécessaire d'enzyme C pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié $(T_p - t_0)/2$ soit $T_{0,5}$.

9. Exemples

9.1. Détermination de la concentration nécessaire d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié. (Tableau 1)

Temps d'écoulement du tampon seul $t_0 = 19,3$ s

Tableau 1 :

Vol (µl) d'enzyme à 100g/l /50 ml de pectine	Concentration (g/l)	Temps écoulement (s)	Temps corrigé (s)	Log. Temps corrigé
--	---------------------	----------------------	-------------------	--------------------

0	0	230 (Tp)	210,7 (Tp - to)	2,32
5	0,01	190	170,7	2,23
25	0,05	107	87,7	1,94
100	0,2	32,8	13,5	1,13
500	1	23,8	4,5	0,65*

Temps corrigé = temps d'écoulement - temps d'écoulement du tampon à pH 3,5

* valeur non prise en compte

équation de la droite de régression (fig.1) $y = -5,8366x + 2,2844$

$$(T_p - t_o) / 2 = 105 \text{ s.}$$

$$\text{Log } 105 = 2,02 \Rightarrow C = (2,28 - 2,02) / 5,84 = 0,044$$

Donc il faut 0,044 g/l d'enzyme pour diminuer de moitié la viscosité d'une solution de pectine de pomme à 10 g/l à 30 °C durant 15 minutes.

On constate que 1 g/l d'enzyme a permis de réduire pratiquement totalement la viscosité de la solution de pectine en 15 minutes.

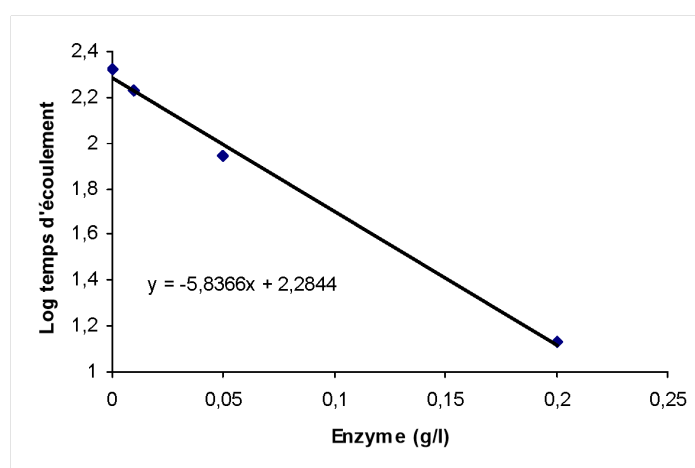


Fig.1 Diminution de la viscosité d'une solution de pectine en fonction de la concentration en enzyme.

9.2. Réduction de la viscosité d'une solution de pectine à 10 g/l en fonction du temps de réaction à 30 °C d'une enzyme à la concentration de 0,1 g/l. (fig. 2) - *A titre d'information*

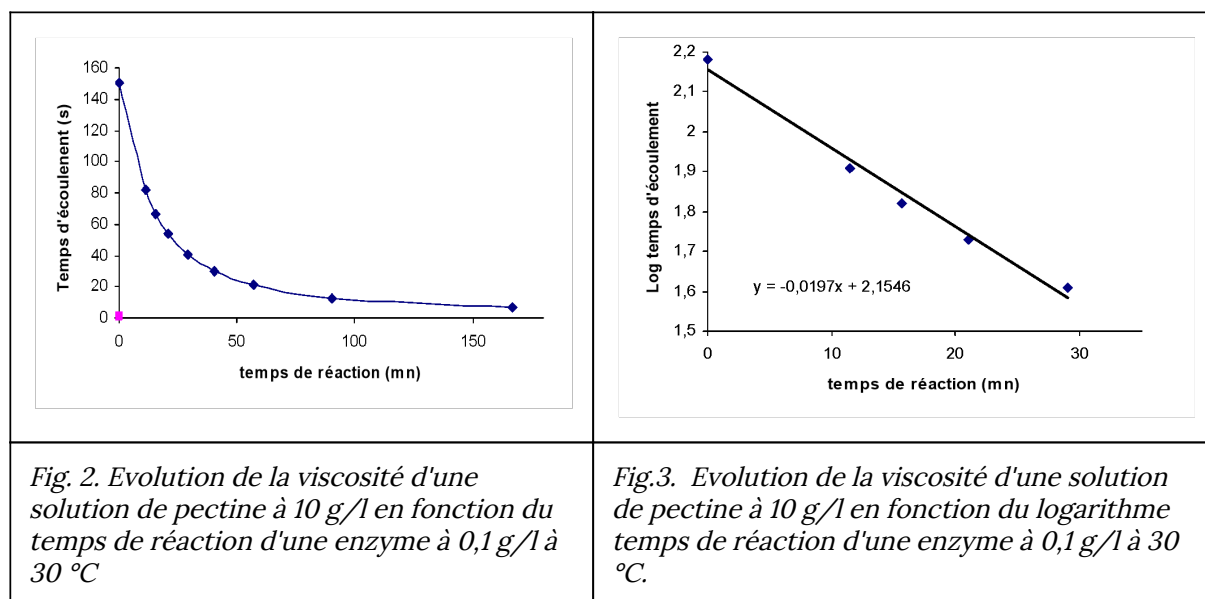
Le temps d'écoulement du tampon est de 19,6 s.

Tableau 2 :

Temps de réaction (mn)	Temps d'écoulement (s)	Temps d'écoulement corrigé* (s)	Log du temps d'écoulement
0	170 (T_p)	150,7 ($T_p - t_0$)	2,18
11,5	101,4	82,1	1,91
15,6	86	66,7	1,82
21,08	72,8	53,5	1,73
29	59,83	40,53	1,61
40,31	48,79	29,49	1,47
57	40,08	20,78	1,32
90	32,25**	12,95	1,11
167	26,25**	6,95	0,84

* Temps d'écoulement corrigé

**valeurs non prises en compte, la quantité de pectine restante limitant la réaction.



Interprétation des résultats

Les valeurs du tableau 2 montrent qu'il faut une durée de réaction $T/2$ de 13,3 minutes pour réduire la viscosité de la solution de pectine à 10 g/l de moitié à 30 °C.

Par le calcul, à partir de la droite de régression de la fig. 3 :

$$\text{Log}75,35 = 1,877$$

$$\text{d'où } T/2 = (2,1545 - 1,877) / 0,0197 = 14,1 \text{ minutes.}$$

10. Bibliographie

1. Bertrand A. détermination de la capacité d'une préparation enzymatique de type polygalacturonase à couper les chaînes pectiques par la mesure de la viscosité OIV FV 1260