

## RÉSOLUTION OENO 5/2007

### CODEX - GLYCOSIDASE

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 :

### GLYCOSIDASE

(activité  $\alpha$ -D-glucosidase)

(EC 3.2.1.21 – CAS n° 9001-22-3)

### Spécifications générales

Ces enzymes ne sont pas trouvées à l'état pur mais elles sont présentes 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 œnologique

Les enzymes de type glycosidases sont utilisées **pour la révélation des arômes des moûts et des vins à partir de leurs précurseurs glycosylés.**

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées d'*Aspergillus niger*.

**Activités secondaires :** protéases, cinnamoyl estérase (cette dernière doit être la plus limitée possible). La méthode de mesure de l'activité cinnamoyl estérase est décrite par ailleurs. Dans le cas présent, la clause des 50% peut s'appliquer (résolution oeno 14/2003 4.1).

## 2. Domaine d'application

La méthode de dosage a été mise au point à l'aide d'une  $\alpha$ -D-glucosidase commercialisée (5.5.). 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

L'hydrolyse enzymatique du  $\alpha$ -D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du glucose et du *para*-Nitrophenol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

## 4. Appareillage

- 4.1. Agitateur magnétique
- 4.2. Bain d'eau à 30°C
- 4.3. Bain d'eau à 100°C
- 4.4. Cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible
- 4.5. Glace pilée
- 4.6. Seringue de précision 500 – 5000  $\mu$ L
- 4.7. Seringue de précision 100  $\mu$ L
- 4.8. Seringue de précision 1000  $\mu$ L
- 4.9. Spectrophotomètre
- 4.10. Tubes eppendorf
- 4.11. Fiole jaugée de 100 mL
- 4.12. pH mètre
- 4.13. Chambre froide à 4°C
- 4.14. Portoir métallique pour tubes eppendorf
- 4.15. Coton cardé
- 4.16. Papier Kraft
- 4.17. Agitateur de type vortex
- 4.18. Chronomètre
- 4.19. Tubes en verre de 15 mL

## 5. Produits

- 5.1. Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pur à 99,5% - PM : 105,99 g/mole)
- 5.2. Acétate de sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  pur à 99% - PM : 82g/mole)
- 5.3. Acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  pur à 96% - PM : 60g/mole)
- 5.4.  $\alpha$ -D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle (Fluka, réf. 73676) à titre d'exemple
- 5.5.  $\alpha$ -D-glucosidase (Fluka ; 250 mg ; 6,3 U/mg, réf. 49290) à titre d'exemple. Une unité, correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1  $\mu$ mole de glucose par minute à pH 5 et 35 °C.
- 5.6. *p*-nitrophénol (*p*-Np) ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$  pur à 99,5% - PM : 139,11 g/mole)
- 5.7. Eau distillée
- 5.8. Préparation enzymatique commerciale à analyser

## 6. Solutions

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

Il est constitué des solutions A et B.

6.1.1. Solution A : introduire 0,5 g d'acétate de sodium (5.2) dans 60 mL d'eau distillée (5.7)

6.1.2. Solution B : introduire 1 mL d'acide acétique (5.3) dans 175 mL d'eau distillée (5.7)

6.1.3. Préparation du tampon acétate de sodium : Mélanger 47,8 mL de solution A (6.1.1) + 152 mL de solution B (6.1.2).

Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.12).

Conserver à 4°C

### 6.2. Solution de $\alpha$ -D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle 4mM

Mettre 0,096 g de  $\alpha$ -D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1.).

### 6.3. Solution de carbonate de sodium 1M

Dissoudre 10,6 g de carbonate de sodium (5.1) dans 100 mL d'eau distillée (5.7) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11). La solution peut être stockée à 4°C (4.13).

### 6.4. Solution mère de *p*-nitrophénol (*p*-Np) à 125 $\mu$ g/mL

Dissoudre 0,01 g de *p*-Np (5.6) dans 80 mL d'eau distillée (5.7).

La solution mère doit être préparée extemporanément.

## 7. Préparation de la gamme étalon de p-nitrophénol (p-Np) de 0 à 50 µg/mL

Elle est constituée à partir de la solution mère de *p*-nitrophénol (*p*-Np) (6.4.) comme indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 : Gamme étalon de *para*-Nitrophénol

| Quantité de p-NP (µg)              | 0   | 2     | 4    | 6    | 8    | 10   |
|------------------------------------|-----|-------|------|------|------|------|
| Concentration en p-NP (µg/mL)      | 0   | 10    | 20   | 30   | 40   | 50   |
| Concentration en p-NP (µmol/mL)    | 0   | 0,072 | 0,14 | 0,22 | 0,29 | 0,36 |
| Volume de solution mère (6.4) (µL) | 0   | 16    | 32   | 48   | 64   | 80   |
| Eau distillée (5.7) (µL)           | 200 | 184   | 168  | 152  | 136  | 120  |

## 8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés extemporanément.

### 8.1. Solution enzymatique à 10 g/l

Placer 1 g de préparation commerciale (5.8) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11), compléter avec de l'eau distillée (5.7), agiter (4.1) 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 (4.19), boucher avec du coton cardé (4.15) recouvert de papier Kraft (4.16) et plonger le tube durant 5 minutes 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 eppendorf (4.10) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.14) dans de la glace pilée (4.5) introduire

100  $\mu$ L de la solution de  $\alpha$ -D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle (6.2), à l'aide d'une seringue de précision (4.7),

100  $\mu$ L de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1), enclencher le chronomètre (4.18)

Après agitation (4.17), les tubes eppendorf sont placés dans le bain d'eau à 30 °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 30°C, dans un bain de glace pilée (4.5)

## 9.2. Dosage du *p*-nitrophénol libéré

A partir des tubes eppendorf contenant les différents milieux réactionnels (9.1)

Ajouter 600  $\mu$ L de solution de carbonate de sodium (6.3), à l'aide d'une seringue de précision (4.8),

1,7 mL d'eau distillée (5.7), à l'aide d'une seringue de précision (4.6),

Placer le mélange résultant dans une cuve (4.4).

Mesurer aussitôt l'absorbance à 400 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.9)

## 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 *p*-nitrophénol de 0 à 50 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).

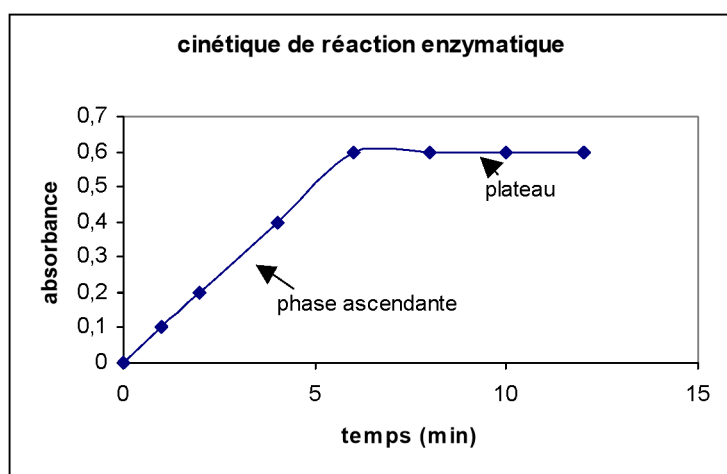


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 12 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=4 min, T=6 min T=8 min T=10 min, T=12 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 *p*-nitrophénol (de 0 à 0,36  $\mu\text{mole/mL}$ ) 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) 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  $Q$  de *p*-nitrophénol libéré (en  $\mu\text{moles}$ ) 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 :

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

Avec  $Q$  : quantité de *p*-nitrophénol formé en  $\mu\text{moles}$  pendant un temps  $T$  (min)

$V$  : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,1 mL

$C$  : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 2 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 :

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

## 11. Caractéristiques

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  $\alpha$ -D-Glucosidase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,01 avec un pourcentage d'erreur de 8,43. Le % d'erreur correspondant à :

- $$\frac{\text{moyenne des écarts - types des valeurs} \times 100}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

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  $\alpha$  de première espèce (5%) - Le risque  $\alpha$  de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.

Si la puissance est faible ( $\alpha$  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 ( $\alpha$  80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avons les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2.

| Dosages                 | Hypothèses de l'analyse de variance | Probabilité | Puissance de l'essai ( $\alpha$ = 5%) | Test Newman-Keuls (*) | Test Bonferroni (**) |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-----------------------|----------------------|
| $\alpha$ -D-glucosidase | Respectées                          | 0,0285      | 42%                                   | Non significatif      | Non 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  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  de première espèce (Test Bonferroni non significatif).