

RÉSOLUTION OENO 6/2007

CODEX - CINNAMOYL ESTERASE

L'ASSEMBLÉE 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 méthode suivante :

Mesure de l'activité cinnamoyl estérase

Cette activité qui peut être présente dans les extraits enzymatiques d'*Aspergillus niger* doit être la plus faible possible car les acides cinnamiques qu'elle libère sont susceptibles d'être par la suite transformés par des microorganismes contaminant le moût ou le vin en "phénols volatils" nauséabonds (4-éthylphénol, 4-éthylgaïacol, 4-vinylphénol, 4-vinylgaïacol, ...).

Faute de disposer du précurseur principal, l'acide para-coumaroyltartrique, deux méthodes sont proposées ; la première fait appel à l'activité chlorogénase d'*Aspergillus niger* soit l'hydrolyse de l'acide chlorogénique (cafféoylquinique) ; elle nécessite la mise en œuvre du matériel traditionnel des mesures enzymatiques. Cette activité est quelquefois présentée comme une activité depsidase (en fait hydrolyse de l'acide m-digallique).

La seconde concerne l'hydrolyse du cinnamate d'éthyle dont la teneur est mesurée par chromatographie en phase gazeuse.

Les deux méthodes ont été comparées, elles donnent des résultats du même ordre de grandeur. Toutefois, deux préparations ne pourront être comparées qu'avec la même méthode.

A. CHLOROGENATE HYDROLASE ou CHLOROGENASE

(EC 3.1.1.42 – CAS n° 74082-59-0)

1. Mesure de l'activité cinnamoyl estérase (CE)

2. Domaine d'application

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

La cinnamoyl estérase dégrade l'acide chlorogénique en libérant de l'acide caféïque. La diminution de l'absorbance mesurée à 350 nm liée à la disparition de ce substrat permet de quantifier l'activité cinnamoyl estérase.

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui permet une chute de l'absorbance de 1 unité à pH 6,5 et à 30 °C.

4. Appareillage

- 4.1. Bain d'eau à 30°C
- 4.2. Bain d'eau à 100°C
- 4.3. Fiole jaugée de 2 litres
- 4.4. Erlen de 125 mL
- 4.5. Fiole jaugée de 100 mL
- 4.6. Fiole jaugée de 1000 mL
- 4.7. Chronomètre
- 4.8. Seringue de précision de 100 µL
- 4.9. Seringue de précision de 1000 µL
- 4.10. Seringue de précision de 5000 µL
- 4.11. Pipette droite de 5 mL graduée
- 4.12. pH mètre
- 4.13. Spectrophotomètre
- 4.14. Tubes à vis en verre de 15 mL
- 4.15. Portoir métallique pour tubes de 15 mL
- 4.16. Cuves de 1 cm de parcours optique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans l'UV
- 4.17. Agitateur de type Vortex

5. Produits

- 5.1. Méthanol (Analytical Reagent Grade - CH_3OH - PM = 32,04 g/mol)
- 5.2. Dihydrogénophosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pur à 99 % - PM = 156,01 g/mol)
- 5.3. Hydroxyde de sodium (NaOH pur à 99 % - PM = 40 g/mol)
- 5.4. Acide chlorogénique (pur à 95 % - PM = 354,30 g/mol)
- 5.5. Eau distillée
- 5.6. Préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1. Méthanol à 80 % (v/v)

Introduire 100 mL de méthanol (5.1) dans un erlen de 125 mL (4.4) additionné de 25 mL d'eau distillée (5.5).

6.2. Solution d'hydroxyde de sodium à 9M :

Introduire 360g d'hydroxyde de sodium (5.3) dans une fiole jaugée de 1000 mL (4.6) et compléter avec de l'eau distillée (5.5).

6.3. Tampon phosphate 0,1M (pH 6,5)

Introduire 31,5 g de dihydrogénophosphate de sodium (5.2) dans une fiole jaugée de 2 litres (4.3) additionné de 1,8 litres d'eau distillée (5.5).

Ajuster le pH à 6,5 à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium (6.2) et d'un pH mètre (4.11). Ensuite ajuster le volume à 2 litres avec de l'eau distillée (5.5).

6.4. Solution d'acide chlorogénique à 0,06 % (p/v)

Dissoudre 0,06 g d'acide chlorogénique (5.4) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.5) additionné de tampon phosphate (6.3) jusqu'au trait de jauge.

7. 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.

7.1. Solution enzymatique à 10 g/L

Placer 1g de préparation commerciale (5.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.5), compléter avec du tampon phosphate (6.3), agiter (4.17) afin d'obtenir un mélange homogène.

7.2. Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 10 g/L (7.1) dans un tube de 15 mL (4.14) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.2).

8. Mode opératoire

8.1. Réaction enzymatique :

Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 4 tubes de 15 mL (4.14) numérotés de 1 à 4, placés dans un portoir (4.15) introduire 100 µL de la solution enzymatique à 10 g/L (7.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8),

500 µL de la solution d'acide chlorogénique (6.4), enclencher le chronomètre (4.7).

Après agitation (4.17), les tubes sont placés dans le bain d'eau à 30 °C (4.1)

- durant 120 mn pour le tube n°1
- durant 240 mn pour le tube n°2
- durant 330 mn pour le tube n°3
- durant 400 mn pour le tube n°4

La réaction est stoppée en ajoutant 5 mL de méthanol à 80 % (6.1) à l'aide d'une pipette droite (4.11) dans chacun des tubes numérotés de 1 à 4, immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 30°C. Les tubes sont ensuite agités.

8.2. Dosage des substances libérées (acide caféïque)

Le milieu réactionnel (8.1) est placé dans une cuve de 1cm de parcours optique (4.16). Mesurer aussitôt l'absorbance à 350 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.13). La mesure sera réalisée contre un blanc qui sera du méthanol à 80% (6.1).

9. Calculs

9.1. 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).

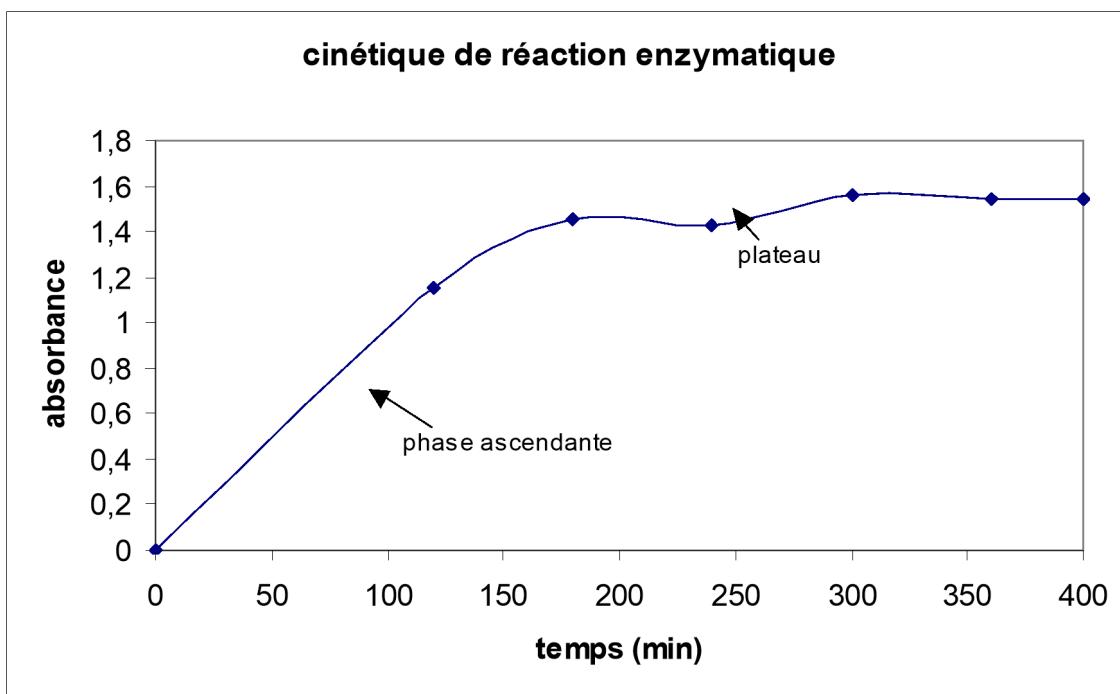


Figure 1: Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 400 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=120 min T=180 min, T=240 min, T=300 min T=360 min T=400 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).

9.2. Calcul de l'activité enzymatique

L'activité cinnamoyl estérase est calculée à partir de la diminution d'absorbance par heure étant donné que cette activité est très faible dans les préparations. La formule de calcul est la suivante

- Activité en U/g = $1000 \times ((DO_0 - DO_T)/T)(V \times C)$

Avec DO : Valeur de l'absorbance du blanc

DO_T : Valeur de l'absorbance au temps T (heure)

V : quantité de solution enzymatique introduite (μL); ici 100 μL

C : concentration de la solution enzymatique (g/L); ici 10 g/L

B. Hydrolyse du cinnamate d'éthyle

1. Principe

La cinnamoyl estérase hydrolyse le cinnamate d'éthyle. La diminution de cet ester mesurée par chromatographie en phase gazeuse permet de quantifier l'activité cinnamoyl estérase.

2. Appareillage

2.1. Chromatographe en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme ou à spectrométrie de masse équipé d'une colonne capillaire de type carbowax 20 M 50 m x 0,2 mm x 0,2 μm d'épaisseur de phase

2.2. pHmètre

2.3. Agitateur magnétique et barreaux d'agitation

2.4. Verrerie de laboratoire (pipettes de précision de 5 mL, fioles coniques, fioles jaugées de 50 mL, 100 mL, flacons en verre de laboratoire de 10 mL, 60 mL, 150 mL...)

2.5. Pipettes Pasteur

2.6. Seringues de précision de 200 μL, 50 μL et de 10 μL

2.7. Etuve à 25°C

2.8. Balance de précision à 0,1 mg/L

3. Produits

- 3.1. Méthanol (Analytical Reagent Grade – CH₃OH – PM = 32,04 g/mol)
- 3.2. Acide citrique pur à 99%
- 3.3. hydroxyde de sodium (NaOH pure à 99% - PM = 40 g/mol)
- 3.4. Cinnamate d'éthyle (pur à 99% - PM = 176 g/mol)
- 3.5. Eau distillée ou permutée
- 3.6. Préparation enzymatique commerciale à analyser.
- 3.7. Ethanol pur à 99 % vol
- 3.8. Ether diéthylique pur à 99 %.
- 3.9. Dodécanol pur

4. Solutions

4.1. Ethanol à 12 % (v/v)

Introduire 12 mL d'éthanol (3.7) dans une fiole jaugée de 100 mL 1 (2.3) compléter au volume avec de l'eau distillée (3.5).

4.2. Solution d'hydroxyde de sodium 4 M

Introduire 16 g d'hydroxyde de sodium pure dans une fiole jaugée de 100 mL compléter avec de l'eau distillée agiter jusqu'à dissolution.

4.3. Tampon citrate à pH 6,5

Introduire 0,05 g d'acide citrique (3.2) dans un flacon de 150 mL (2.3), rajouter 100 mL d'éthanol à 12 % vol (4.1) dissoudre à l'aide d'un agitateur magnétique. Placer sous agitation magnétique en présence de l'électrode du pH mètre (2.2) amener à pH 6,5 en ajoutant goutte à goutte l'hydroxyde de sodium 4 M (4.2).

4.4. Solution mère de cinnamate d'éthyle à 500 mg/L

A l'aide d'une seringue de précision (2.5) placer 50 µL de cinnamate d'éthyle (3.4) dans une fiole jaugée de 100 mL contenant un peu d'éthanol pur (3.7) compléter au trait de jauge avec de l'éthanol pur (3.7) homogénéiser

4.5. Solution de cinnamate d'éthyle à 25 mg/L dans le tampon citrate

Dans une fiole jaugée de 100 mL placer 5 mL mesuré avec une pipette de précision (2.3) de solution mère de cinnamate d'éthyle à 500 mg/L (4.4) compléter à 100 mL avec le tampon citrate à pH 6,5 vol (4.3). Homogénéiser

Remarque : il ne faut pas préparer une solution de cinnamate d'éthyle plus concentrée car cet ester risquerait d'être partiellement insoluble.

4.6 Solution de dodécanol à 0,5 g/L (étalon interne)

A l'aide d'une seringue de précision (2.5) placer 50 µL de dodécanol pur (3.9) dans une fiole jaugée de 100 mL contenant un peu d'éthanol pur (3.7) compléter au trait de jauge avec de l'éthanol pur (3.7) homogénéiser.

5. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple.

6. Mode opératoire

6.1. Réaction enzymatique : Dans un flacon de laboratoire de 60 mL placer 50 mL de solution de cinnamate d'éthyle à 25 mg/L (4.5) ajouter environ 100 mg de la préparation enzymatique commerciale à analyser (3.6) pesée avec précision (2.7) soit P le poids.

Après agitation (2.2), le flacon est bouché et laissé sur la paillasse ou si possible dans une étuve à 25 °C (2.6)

6.2. Un prélèvement de 200 µL est effectué avec une seringue de précision (2.5) après 3 heures, 24 heures, 72 heures.

6.3. La réaction est stoppée en ajoutant le prélèvement (6.2) de 200 µL dans un flacon de 10 mL contenant 0,5 mL de méthanol (3.1) et 1 mL d'éther (3.8)

6.4. Ajout de l'étalon interne

Dans la préparation (6.3) ajouter A l'aide d'une seringue de précision (2.5) 50 µL de dodécanol à 500 mg/L (4.6) homogénéiser.

6.5. Blanc

Procéder comme en 6.3 et 6.4 en ne mettant pas les 200 µL du prélèvement de la réaction enzymatique (6.2)

6.6. Solution de référence

Procéder comme en 6.3 et 6.4 en plaçant dans le flacon (6.3) 200 µL de solution de cinnamate d'éthyle à 25 mg/L (4.5) à la place du prélèvement de la réaction enzymatique (6.2)

6.7. Chromatographie

6.7.1. Injecter 2 µL du blanc (6.5) dans le chromatographe pour repérer l'étalon interne. Lancer le programmeur de température et l'acquisition des données.

6.7.2. Injecter 2 µL de la solution de référence pour repérer le cinnamate d'éthyle (c.e) et l'étalon interne (e.i) en mesurer les surfaces respectives Sce0 Sei0

6.7.3. Injecter dans les mêmes conditions que 6.7.2 les prélèvements 6.4 après 3 heures puis 24 heures puis 72 heures. Soit les surfaces respectives de cinnamate d'éthyle résiduel et d'étalon interne S3 et Sei3; S24 Sei24, S72 Sei72.

Déterminer la quantité de cinnamate d'éthyle résiduelle pour chacun des prélèvements ; par exemple pour 72 heures.

$$CE72 = \frac{25 \times Sei0}{SCE0} \times \frac{SCE72}{Sei72}$$

CE consommé en 72 heures = 25 – CE 72

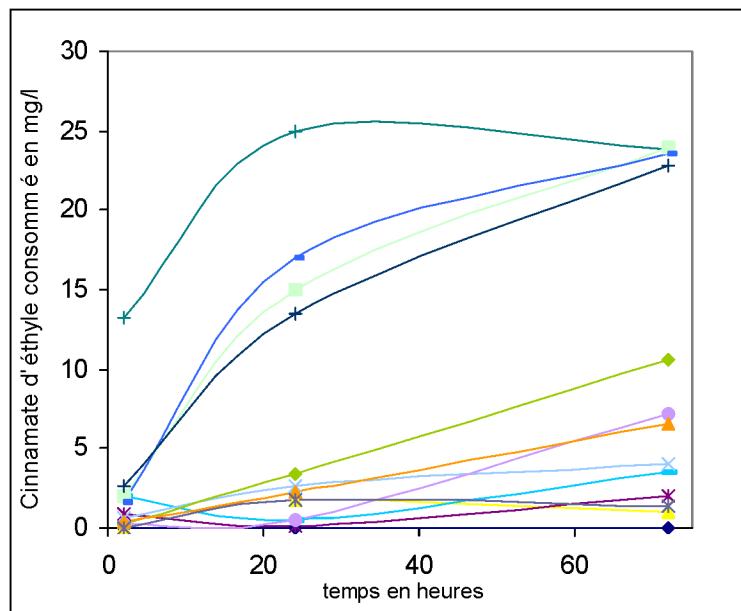
Activité cinnamyl esterase en mg de cinnamate d'éthyle hydrolysé par heure et par g de préparation enzymatique

$$\text{Activité CE en mg CE/g enzyme/heure} = \frac{25 \times CE72 \times 1000}{P \times 25 \times 72}$$

P = poids d'enzyme ajouté dans la préparation (6.1) en mg/L.

Commentaires : La méthode est librement adaptée de Barbe (1995).

La réaction ayant lieu à pH 6,5 est beaucoup plus complète qu'au pH du vin où elle est environ 10 fois plus lente ; donc, si après 72 Heures, quelques mg seulement de cinnamate d'éthyle ont été dégradés on peu considérer que l'activité CE dans le vin sera négligeable.



Exemples d'activités cinnamoyl estérase mesurées à pH 6,5, de préparations enzymatiques commerciales.

7. Bibliographie

1. Barbe ch., 1995, recherche sur les activités estérases contaminantes des préparations pectolytiques. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux 2.