RÉSOLUTION OIV-OENO 497-2013

ENVELOPPES CELLULAIRES DES LEVURES – Codex (Ecorces de levure)

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,

SUR PROPOSITION du groupe d'experts « Microbiologie » et du groupe d'experts « Spécification des produits œnologiques »

CONSIDÉRANT la monographie actuelle sur les « écorces de levures » publiée dans le Codex Oenologique International

DÉCIDE de remplacer la monographie existante figurant dans le Codex Oenologique International par la monographie suivante :

ENVELOPPES CELLULAIRES DES LEVURES (Ecorces de levure)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les enveloppes cellulaires des levures sont obtenues à partir de levures *Saccharomyces spp*. Le mode de préparation doit respecter la surface et donc la capacité d'absorption.

Les enveloppes cellulaires de levures sont disponibles sous forme de poudre fine ou de micro granulés non hygroscopiques, de couleur crème et dégageant une légère odeur. Elles ne laissent aucun résidu nocif dans les moûts de raisin et les vins. Dans le processus, il n'y a pas d'addition d'antibiotiques ou de composés autres que ceux nécessaires à la croissance de la levure.

Les enveloppes cellulaires de levures sont conditionnées de manière à éviter les phénomènes d'oxydation.

Elles sont utilisées pour prévenir et faire face aux arrêts de fermentations. Elles présentent la propriété de fixer certains acides gras (octanoïque et décanoïque) qui perturbent la perméabilité membranaire des levures.

Lorsque les enveloppes cellulaires de levures proviennent de levures génétiquement modifiées, celles-ci doivent avoir été soumises à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

L'utilisation d'enveloppes cellulaires de levures est soumise à une limite d'apport.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner :

- Le nom du genre et de l'espèce
- Les instructions d''utilisation
- Les additifs éventuels
- La pureté, Le numéro de lot, la date d'expiration et les conditions de stockage sous une température bien définie, l'humidité et les conditions de ventilation
- L'indication si les enveloppes cellulaires proviennent de levures obtenues par modification génétiques ainsi que le caractère modifié si c'est le cas

3. COMPOSITION DES ENVELOPPES CELLULAIRES DE LEVURES (VALEURS)

Matière sèche ≥ 94 % m/m selon la méthode décrite à l'annexe 2

Glucides > 40% m/m

Glucides :

La teneur totale en glucanes et mannanes doit compter pour plus de 60 % des glucides totaux selon la méthode décrite à l'annexe 1.

Solubilité < 10 % m/v

4. ADDITIFS ET INGRÉDIENTS

Conformément à la législation.

5. LIMITES ET MÉTHODES D'ESSAI

5.1. Plomb

Procéder à l'analyse selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

5.2. Mercure

Procéder à l'analyse selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.3. Arsenic

Procéder à l'analyse selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur doit être inférieure à 3 mg/kg.

5.4. Cadmium

Procéder à l'analyse selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg.

6. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

6.1. Levures revivifiables

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

Teneur : Moins de 100 UFC par g.

6.2. Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

Teneur : Moins de 10^3 UFC par g.

6.3. Bactéries acétiques

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

Teneur : Moins de 10^3 UFC par g.

6.4. Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

Œnologique International.

Teneur : Moins de 10^3 UFC par g.

6.5. Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

Teneur : Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

6.6. Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

Teneur : Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

6.7. Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

Teneur : Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

6.8. Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

Teneur : Moins de 100 UFC par g.

7. HYGIÈNE

Les écorces de levures sont produites en conformité avec les bonnes pratiques de fabrication des produits alimentaires.

Elles ne doivent pas présenter d'odeur de rance et ne doivent pas céder d'arôme anormal au vin (arôme de levure).

8. ACTIVITÉ

L'effet stimulateur des écorces de levures est dû à leur capacité à absorber certaines substances toxiques pour les levures, qu'elles produisent au cours de leur croissance. L'acide décanoïque est l'inhibiteur de croissance le plus important.

L'activité technologique (AT) exprimée en grammes (g) de produit peut ainsi être

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

évaluée par l'absorption d'acide décanoïque.

Un gramme d'enveloppes cellulaires de levures ajouté à 100 mL d'une solution d'alcool à 10 % vol. et à pH 3,5 contenant 2 mg/L d'acide décanoïque devrait absorber, après 24 heures de contact à 18-22 °C, 50 % de cet acide.

Un contrôle peut être effectué par dosage de l'acide décanoïque par chromatographie en phase gazeuse avec détection en ionisation de flamme (GC/FID) en respectant les procédures suivantes données comme exemple :

- Appareillage de chromatographie,
- Colonne capillaire polaire, de type FFAP par exemple, de 50 m de long et de 0,2 mm de diamètre intérieur,
- Support en silice fondue,
- Température programmée de 60 ºC à 180 ºC, ou 4 ºC/min,
- Volume injecté de 1 µL de solution hydroalcoolique (10 % vol.) à 2 mg/L d'acide décanoïque traité avec des écorces de levure,
- Étalon interne d'acide heptanoïque à 2 mg/L après ajout
- Solution de référence : solution hydroalcoolique (10 % vol.) à 2 mg/L d'acide décanoïque.

9. STOCKAGE

Les enveloppes cellulaires de levures doivent être toujours stockées en emballages étanches et en environnement tempéré.

Annexe 1

Dosage des glucanes et de mannanes dans les enveloppes cellulaires des levures

Les parois cellulaires des levures sont soumises à une pré-solubilisation avec du H_2SO_4 concentré avant de subir une hydrolyse avec du H_2SO_4 à 128°C dans une étuve. Cette hydrolyse totale des glucanes et des mannanes produit des quantités proportionnelles de glucose et de mannose qui sont dosées par chromatographie ionique.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

Afin d'éliminer le glycogène, la méthode doit être précédée par un prélavage de l'échantillon avec une solution de NaOH à 0,5 mole/L pendant une heure à température ambiante, suivi d'une centrifugation et d'un lavage supplémentaire à l'eau.

1. Matériel et appareillage

- Fiole bouchée de 100 mL (Verre Duran ou Schott)
- Éprouvette
- Filtre en polyethersulfone de 0, 45 µm de diamètre moyen des pores
- Étuve
- H2SO4 72 %
- Système de chromatographie ionique avec détecteur par ampérométrie pulsée disposant d'une électrode en or
- Mixer Vortex
- NaOH 32 %
- Fioles jaugées de 100 mL et 50 mL
- Eau distillée
- Eau pour CLHP
- Colonne de chromatographie ionique (Metrosep Carb1 Metrohm ou équivalent)

2. Méthode

2.1. Préparation des standards

- Peser 50 mg de glucose (noter le poids exact Pglu) et 50 mg de mannose (noter le poids exact Pman)
- Aller à l'étape 2.3.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

2.2. Préparation de l'échantillon

- Peser 50 mg de parois cellulaires de levures (noter le poids exact Pl)
- Aller à l'étape 2.3.

2.3. Pré-solubilisation

- Ajouter 3,3 mL de H_2SO_4 72 %
- Agiter l'éprouvette bouchée avec le mixer Vortex
- Laisser reposer une heure à température ambiante en agitant toutes les 10 min.

2.4. Hydrolyse acide

- Verser le contenu de l'éprouvette dans une fiole de 100 mL
- Ajouter 40 mL d'eau distillée
- Refermer la fiole
- Placer la fiole bouchée dans une étuve à 128 ºC et laisser incuber pendant 3 heures
- Retirer la fiole et la refroidir
- Neutraliser avec 8,112 mL de NaOH 32 %
- Décanter le contenu de la fiole dans une fiole jaugée de 100 mL
- Ajuster à 100 mL avec de l'eau distillée
- Filtrer la solution au travers d'un filtre Acrodisc IC

2.5. Chromatographie

2.5.1. Préparation des standards

- Prélever 2,5 mL des solutions hydrolysées de glucose et de mannose obtenues à

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

l'étape 2.4.

- Transférer dans une fiole jaugée de 50 mL
- Ajuster avec de l'eau distillée
- Placer dans un flacon de chromatographie pour le passeur automatique d'échantillon

2.5.2. Préparation de l'échantillon

- Prélever 7,5 mL du matériel hydrolysé obtenu à l'étape 2.4.
- Transférer dans une fiole jaugée de 50 mL
- Ajuster avec de l'eau distillée
- Placer dans un flacon de chromatographie pour le passeur automatique d'échantillon

2.5.3. Préparation de la phase mobile

- Mesurer un litre d'eau pour CLHP
- Filtrer en utilisant une membrane de 0,45 µm
- Dégazer sous vide pendant 1 h 30 min
- Mesurer 7,57 mL de NaOH 51 % dans la fiole destinée à la phase mobile
  ! Prendre bien soin d'utiliser une fiole en polypropylène pour la phase mobile
- Ajouter le litre d'eau dégazée
- Agiter à l'aide d'un agitateur magnétique

2.5.4. Solutions d'étalonnage pour la chromatographie

- Préparer, en utilisant de l'eau pour CLHP, des solutions de glucose et de mannose à 10 mg/L, 30 mg/L et 40 mg/L
- Les utiliser pour étalonner la chromatographie

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

2.5.5. Conditions chromatographiques

- Mettre la colonne en conditions en utilisant la phase mobile à un débit de 1 mL/min pendant 2 heures.
- Injecter 20 µl :
    - Des trois solutions d'étalonnage (voir § 2.5.4.)
    - De la solution standard
    - De la solution standard

Étalonner le système avec la solution d'étalonnage. Tracer la courbe d'étalonnage Aire = f (concentration)
L'équipement de chromatographie donnera la concentration en mg/L :
De la solution standard :
Concentration du mannose en mg/L : CmanSt (mg/L)
Concentration du glucose en mg/L : CgluSt (mg/L)
De la solution d'échantillon :
Concentration du mannose en mg/L : CmanL (mg/L)
Concentration du glucose en mg/L : CgluL (mg/L)

3. Calcul

3.1. Calcul du rendement

Calculer le rendement pour les solutions standards de mannose et de glucose de la manière suivante :
Rman = CmanSt (mg/L) / Pman (mg) x 10 x (2,5/50)
Rglu = CgluSt (mg/L) / Pglu (mg) x 10 x (2,5/50)
Pman et Pglu sont les poids mesurés de mannose et de glucose en mg (voir § 2.1.)

4. Concentrations des mannanes et des glucanes dans les parois cellulaires des levures

Concentration des mannanes en g%g :

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

Cmannanes = 0,9* [(CmanL x (50 / 7,5)) / (Pl (mg) x 10)] * (1 / Rman)

Concentration des glucanes en g/g :

Cglucanes = 0,9* [(CgluL x (50 / 7,5)) / (Pl (mg) x 10)] * (1 / Rglu)

Pl : poids des parois cellulaires de levures (voir § 2.2.)

Rman et Rglu : rendements du mannose et du glucose (voir § 3.1.)

ANNEXE 2

DETERMINATION DU POURCENTAGE DE LA MATIERE SECHE INSOLUBLE

1. PRINCIPE

L'analyse consiste à comparer la matière sèche totale (MS) des enveloppes cellulaires de levures avec la matière sèche restante (MS insoluble), après lavage à chaud.

2. MATERIEL ET REACTIFS

Centrifugeuse 4200 tr/mn et accessoires

Balance au 1/10 mg

Poste de pesées des MS (FST 350)

Etuve 105 °C +/- 1 °C

3. MODE OPERATOIRE

Obtention de la partie insoluble des enveloppes cellulaires de levures

Dans un pot de centrifugeuse taré placer environ 10 g d'enveloppes cellulaires de levure préalablement séchées dans une étuve à 105 °C jusqu'à poids constant. Relever le poids exact, soit : M1.

Mettre en suspension dans de l'eau très chaude (70 - 80 °C)

Bien homogénéiser

Centrifuger 10 mn à 4200 tr/mn.

Jeter le surnageant, reprendre à l'eau très chaude et centrifuger 10 mn à 4200 tr/mn.

Recommencer l'opération une troisième fois

Placer le pot de centrifugeuse taré contenant le culot dans une étuve à 105 °C jusqu'à

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

poids constant et peser. Soit M2 le poids des enveloppes lavées et séchées constituant la MS insoluble

4. CALCULS

Pourcentage de la matière sèche insoluble

% MS insoluble = (M2/M1) x 100

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013