RESOLUTION OIV/OENO 348/2010

METHODE QUALITATIVE POUR LA DETECTION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE D'AMINES BIOGÈNES PRODUITES PAR DES BACTERIES LACTIQUES

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

CONSIDÉRANT l'alinéa iv du paragraphe 2 de l'Article 2 de l'accord daté du 3 avril 2001 instituant l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission « Méthodes d'analyse » et du groupe de travail « Spécification des produits œnologiques »,

DÉCIDE de compléter le Chapitre II du Codex œnologique international en y insérant la technique d'analyse et de contrôle suivante :

METHODE QUALITATIVE POUR LA DETECTION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE D'AMINES BIOGÈNES PRODUITES PAR DES BACTERIES LACTIQUES

1. PRINCIPE

La méthode détermine la capacité de bactéries lactiques à produire des amines biogènes (AB) dans un milieu de culture liquide contenant le précurseur d'acide aminé correspondant. Cette méthode permet la séparation et l'identification de l'histamine (HIS), de la tyramine (TYR), de la putrescine (PUT), de la cadavérine (CAD) et de la phényléthylamine (PEA) au moyen de la chromatographie en couche mince (CCM).

2. RÉACTIFS

2.1. Acides aminés : monochlorhydrate de L-histidine, sel disodique de L-tyrosine, chlorhydrate de L-ornithine, monohydrate de L-lysine et L-phénylalanine.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

2.2. Amines : dichlorhydrate d'histamine, chlorhydrate de tyramine, dichlorhydrate de 1,4-diaminobutane, dichlorhydrate de 1,5-diaminopentane, chlorhydrate de β-phényléthylamine.

2.3. Chlorure de dansyl.

2.4. Acétone.

2.5. Chloroforme.

2.6. Triéthylamine.

2.7. Alcool isopropylique.

2.8. Triéthanolamine.

2.9. Plaques de chromatographie en couche mince (CCM) (10 x 20 plaques prêtes à l'emploi avec 0,20 mm de gel de silice 60).

3. SOLUTIONS NORMALES

Des solutions stocks sont préparées en dissolvant 0,2 g de chaque amine (HIS, TYR, PUT, CAD et PEA) dans 10 mL d'éthanol 40 %. On mélange 1 ml de chacune de ces solutions stock et on complète jusqu'au volume final de 10 mL avec eau. On obtient une solution de référence contenant 2 g/l de chaque amine. Les amines sont converties en leurs dérivés de dansyl fluorescent comme suit : un volume de 250 mM Na_2HPO_4, 0,1 volumes de 4N NaOH et 2 volumes de solution de chlorure de dansyl (5 mg/mL chlorure de dansyl dans acétone) sont ajoutés à un volume de l'échantillon. Le mélange est ensuite vortexé et incubé à 55° C pendant 1 heure dans le noir.

4. MICROORGANISMES ET CONDITIONS DE CROISSANCE

Des souches d'O. oeni sont cultivées dans un milieu MRS (Merck) pH 4,8, auquel est ajouté du jus de tomate 10 %. Des souches des genres Lactobacillus et Pediococcus sont cultivées dans un milieu MRS pH 6,3. Toutes les bactéries sont incubées à 30° C.

Des acides aminés précurseurs des amines biogènes : de l'histadine (5 mg/mL), de la tyrosine (5 mg/mL), de l'ornithine (5 mg/mL), de la lysine (5 mg/mL) et de la

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

phénylalanine (5 mg/mL) sont ensuite ajoutés aux milieux de culture. Les échantillons sont analysés après 9 à 12 jours de croissance.

5. CONDITIONS CCM

Les amines sont fractionnées sur des plaques couvertes de gel de silice (gel de silice 60 F254s). Des extraits de dérivés amines (10 μl) sont appliqués à 2 cm de la base des plaques au moyen de pipettes capillaires. Les composés de dansyl sont séparés par développement ascendant sur 17 cm dans du chloroforme:triéthylamine (4:1). Les taches sont visualisées sous UV au moyen d'un diaphanoscope équipé d'un système d'acquisition d'images. Si ce type d'instrument n'est pas disponible, la plaque peut être pulvérisée d'alcool isopropylique:triéthanolamine (8:2) pour renforcer la fluorescence et être visualisée sous une source UV classique.

La limite de détection des amines TYR, PUT, CAD et PEA est de 0,01 mg/ml et la détection de limite de HIS est 1 mg/mL. La méthode a démontré moins de sensibilité envers HIS, cependant le niveau de détection est suffisant pour détecter la production HIS où la bactérie est cultivée dans un milieu de culture supplémenté de 5mg/mL d'histidine décrit précédemment.

6. ANALYSE DES AMINES BIOGÈNES DANS DES CULTURES BACTÉRIENNES

Des souches bactériennes sont cultivées comme indiqué au paragraphe 4. Après l'incubation, le milieu liquide est centrifugé et la teneur en AB des surnageants est analysée. L'analyse des amines produites par les souches bactériennes s'effectue directement sur les surnageants bactériens, comme indiqué ci-avant.

Les taches d'amines qui restent en surface de la plaque sont : PEA, TYR, HIS, CAD, PUT.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Costantini A., Cersosimo M., Del Prete V., Garcia-Moruno E. (2006). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, TLC and HPLC of strains isolated from wine and must. Journal of food protection, 69 (2): 391-396.
2. Garcia-Moruno E., Carrascosa A.V., Muñoz R. (2005). A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. Journal of food protection, 68 (3): 625-629.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010

3. Garcia-Moruno E. A method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography (TLC), 2007 OIV FV 1243

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2010