RÉSOLUTION OIV/OENO 367/2009

MONOGRAPHIE SUR LES CHITINE-GLUCANE

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 du groupe d'experts « Spécifications des produits oenologiques »

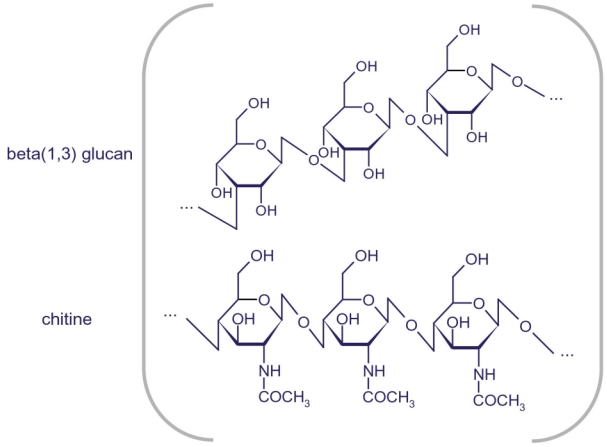
DECIDE de compléter le Codex OEnologique international par la monographie suivante :

CHITINE-GLUCANE

$[C_6H_{10}O_5]_m$ - $[C_8H_{13}NO_5]_n$

Numéro CAS Chitine : **□1398-61-4□**

Numéro CAS □-glucan : **□9041-22-9□**



1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le chitine-glucane d'origine fongique est un copolymère naturel, le constituant principal des parois cellulaires d'*Aspergillus niger*. Il est extrait et purifié à partir du mycelium d'*Aspergillus niger*. Cette ressource fongique est un sous-produit de production de l'acide citrique à destination des marchés alimentaires et

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

pharmaceutiques.

Le chitine glucan est constitué des polysaccharides chitine (unités de répétiton N-acetyl-D-glucosamine) et 1,3-□-glucane (unité de répétition D-glucose). Les deux polymères sont liés de manière covalente et forment un réseau tridimentionnel. La proportion chitine/glucane est de 25:75 à 60:40 (m/m).

Il est utilisé comme agent de collage des moûts au moment du débourbage afin de réduire la teneur en colloïdes et la turbidité.

Il est également utilisé pour la stabilisation des vins avant mise en bouteilles après la fermentation alcoolique des vins. Ce polymère a un pouvoir stabilisant vis-à-vis des casses ferriques. Il permet également d'éliminer des composés indésirables tels que les métaux lourds (plomb, cadmium), les mycotoxines, etc.

2. SYNONYMES

Poly(N-acetyl-D-glucosamine)-poly(D-glucose) et 1,3-□-glucane

3. ETIQUETAGE

Les indications suivantes doivent figurer sur l'étiquette d'emballage : origine fongique, produit à usage œnologique, les conditions d'utilisation, de conservation et la date limite d'utilisation.

4. CARACTERES

4.1. Aspect

Le chitine-glucane se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche. Le chitine-glucane est pratiquement totalement insoluble en milieu aqueux ou organique.

4.2. Pureté et résidus solubles

La pureté du produit doit être égale ou supérieure à 95 %.

Placer en solution 5 g de chitine-glucane dans 100 ml d'eau bi-distillée et agiter 2 minutes. Filtrer après refroidissement sur filtre serré ou sur membrane.

Evaporer le filtrat et sécher à 100-105 °C. La teneur en matières solubles ne doit pas être supérieure à 5 %.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

5. ESSAIS

5.1. Identification et rapport chitine-glucane

5.1.1. Détermination du rapport chitine-glucane

On détermine le rapport chitine/glucane à l'aide du spectre de RMN ^{13}C en phase solide, par comparaison avec le spectre d'un témoin chitine pure.

Cette méthode est détaillée en annexe I.

5.2. Perte à la dessiccation

Dans une coupelle en verre, préalablement séchée pendant 1 heure à l'étuve 100-105 °C et refroidie dans un dessiccateur, placer 10 g du produit à analyser. Laisser dessécher

dans l'étuve à 100-105 °C jusqu'à masse constante. Peser la quantité de résidu sec après

refroidissement au dessiccateur.

La perte de poids doit être inférieure à 10 %.

Remarque : toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées en poids sec hormis pour les analyses microbiologiques

5.3. Cendres

Incérer sans dépasser 600°C le résidu laissé dans la détermination de la perte à la dessiccation décrit à l'alinéa 5.2. Laisser la calcination s'effectuer pendant 6 heures. Laisser le creuset refroidir dans un dessiccateur et peser.

Le taux de cendres totales ne doit pas être supérieur à 3%.

5.4. Préparation de la solution pour les essais

Avant le dosage des métaux, l'échantillon est mis en solution par une digestion acide (HNO_3, H_2O_2 *et* HCl). La minéralisation s'opère en microonde fermé. L'échantillon ne subit

ni broyage ni séchage avant minéralisation.

Les réactifs utilisés sont les suivants HNO_3 (65%) (Suprapur), HCl (37%) (Suprapur), H_2O_2 (35%) pour la minéralisation du chitine-glucane. L'échantillon de chitine-glucane 0,5 à 2 g est placé dans un matras auquel est ajouté 25 ml d' HNO_3 , 2 ml d'HCl et 3 ml

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

d' H_2O_2. L'ensemble est alors soumis à une digestion par micro-ondes (Puissance de 60% pendant 1 min, 30% pendant 10 min, 15% pendant 3 min, et 40% pendant 15 min). La solution est alors diluée et portée à un volume final de 25,0 ml dans une fiole jaugée à l'aide d'eau bidistillée.

Les teneurs des métaux peuvent alors être recherchées.

5.5. Plomb

Le plomb est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en plomb doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du plomb par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.6. Mercure

Le mercure est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en mercure doit être inférieure à 0,1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du mercure par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.7. Arsenic

L'arsenic est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage de l'arsenic par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.8. Cadmium

Le cadmium est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthodedécrite en annexe II.

La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du cadmium par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.9. Chrome

Le chrome est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

décrite en annexe II.

La teneur en chrome doit être inférieure à 10 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du chrome par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.10. Zinc

Le zinc est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en zinc doit être inférieure à 50 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du zinc par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.11. Fer

Le fer est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en fer doit être inférieure à 100 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du fer par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.12. Cuivre

Le cuivre est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en cuivre doit être inférieure à 30 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du cuivre par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.13. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE

5.14. Germes totaux

Le dénombrement des germes totaux est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30 °C sur milieu PCA décrite en annexe III.

5.15. Moins de 1000 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

5.16. Enterobactéries

Le dénombrement des Entérobactéries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30°C décrite en annexe IV.

Moins de 10 UFC/g de préparation.

5.17. Salmonelles

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international

Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

5.18. Coliformes

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

Moins de 100 UFC/g de préparation

5.19. Levures

Le dénombrement des Levures est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 25 °C sur milieu YGC décrite en annexe V.

Moins de 100 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.20. Moisissures

Le dénombrement des Moisissures est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 25 °C sur milieu YGC décrite en annexe VI.

Moins de 100 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

6. RECHERCHE EN OCHRATOXINE A

Placer le chitine-glucane en solution aqueuse (eau distillée) à 1% et agiter pendant 1 heure, puis effectuer le dosage à l'aide de la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

Moins de 5 µg/kg.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

7. CONSERVATION

Conserver en emballage clos, à l'abri de l'humidité, dans des locaux tempérés

Annexe I

Dosage de détermination du rapport chitine/glucan

1. PRINCIPE

Cette méthode consiste à déterminer le rapport chitine/glucane à l'aide du spectre de RMN ^{13}C en phase solide.

2. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

2.1. Echantillon de chitine glucane
2.2. Eau osmosée
2.3. Acide chlorhydrique 1M
2.4. Ethanol pur
2.5. Chloroforme pur
2.6. Méthanol pur
2.7. Acétone
2.8. Matériel courant de laboratoire, pipettes, vases cylindriques en verre, filtres de porosité 30 µm...
2.9. Agitateur rotatif
2.10. Centrifugeuse de laboratoire
2.11. Conductimètre.
2.12. Appareil de résonnance magnétique nucléaire

3. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Avant le dosage, les échantillons sont préparés suivant un protocole précis décrit ci-après :

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

3.1. Lavage à l'HCl 1M (2.3)

Cette étape consiste à mélanger dans un tube 2g de chitine glucane (2.1) et 40ml de HCl 1M

Ce mélange est agité 30min à 320 rpm puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. On élimine le surnageant.

Cette étape est renouvelée une fois

3.2. Lavage à l'eau osmosée

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40 ml d'eau osmosée (2.2)

Ce mélange est centrifugé 10 min à 4000 rpm. On élimine le surnageant.

Cette étape est renouvelée jusqu'à obtenir une conductivité du surnageant inférieure à 100µS/cm^2.

3.3. Lavage à l'éthanol

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40ml d'éthanol (2.4).

Ce mélange est centrifugé 10 min à 4000 rpm. On élimine le surnageant.

Cette étape est renouvelée une fois

3.4. Lavage au chloroforme/méthanol

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40ml d'un mélange 50/50,v/v de chloroforme (2.5) et méthanol (2.6).Ce mélange est agité 30min à 320 rpm puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. On élimine le surnageant.

Cette étape est renouvelée une fois

3.5. Lavage à l'acétone et séchage

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40ml d'acétone (2.7).

Ce mélange est agité 30min à 320 rpm puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min.

Après la centrifugation, verser le surnageant sur un filtre de 30 µm, rincer le tube flacon avec de l'acétone (2.7) et verser le tout sur le filtre.

Déposer la matière située sur le filtre dans un cristallisoir et laisser sécher.

Après le séchage, le produit est prêt à être analysé par RMN.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

4. MODE OPERATOIRE

Les échantillons préparés sont ensuite analysés sur l'appareil de résonnance magnétique nucléaire Bruncker avance DSX 400WB.(ou équivalent)

Les conditions d'analyses sont les suivantes :

4.1. Champ magnétique : 9,04 Tesla

4.2. Fréquence de Larmor : 83 kHz

4.3. Temps écoulé entre 2 impulsions magnétiques : 5s

4.4. Temps écoulé pendant lequel l'impulsion magnétique est appliquée : 5,5ms

4.5. Nombre de séquence d'impulsion magnétique : 3000

5. EXPRESSION DES RESULTATS

5.1. La proportion en beta-glucane est déterminée à partir de l'aire des quatre bandes de résonnance.

5.2. Les résultats sont exprimés en mol%.

Annexe II

DOSAGE DES METAUX PAR Spectroscopie d'émission atomique

1. PRINCIPE

Cette méthode consiste à mesurer l'émission atomique par une technique de spectroscopie optique.

2. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Avant le dosage des métaux, l'échantillon est mis en solution par une digestion acide (HNO_3 , H_2O_2 et HCl). La minéralisation s'opère en microonde fermé.L'échantillon ne subit ni broyage ni séchage avant minéralisation.

Les réactifs utilisés sont les suivants HNO_3 (65%) (Suprapur), HCl (37%) (Suprapur), H_2O_2 (35%) pour la minéralisation du chitosane. L'échantillon de chitine-glucane 0,5 à 2 g est placé dans un matras auquel est ajouté 25 ml d' HNO_3 , 2 mL d'HCl et 3 ml d' H_2O_2.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

L'ensemble est alors soumis à une digestion par micro-ondes (Puissance de 60% pendant 1 min, 30% pendant 10 min, 15% pendant 3 min, et 40% pendant 15 min). La solution est alors diluée et portée à un volume final de 25,0 ml dans une fiole jaugée à l'aide d'eau bidistillée.

Les teneurs des métaux peuvent alors être recherchées.

3. MODE OPERATOIRE

Les échantillons mis en solution sont nébulisés et l'aérosol ainsi produit est transporté dans une torche à plasma induit par un champ électrique à haute fréquence. Les spectres d'émission sont dispersés par un spectromètre à réseau et l'intensité des raies est évaluée par un détecteur (photomultiplicateur). Les signaux du détecteur sont traités et contrôlés par un système informatique. Une correction du bruit de fond est utilisée pour compenser les variations de bruit de fond.

4. EXPRESSION DES RESULTATS

Les concentrations en métaux dans les produits œnologiques sont exprimées en mg/kg

Annexe III

Dénombrement des germes totaux par comptage des colonies obtenues à 30°C

Milieu PCA

Composition :

Peptone : 5,0g

Extrait de levure : 2,5g

Glucose: 1,0g

Agar-agar : 15g

Ajuster à : pH 7,0

Eau : q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sont ensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spiral.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 30 °C en aérobiose pendant 48 à 72 heures.

Compter le nombre d'UFC

Annexe IV

Dénombrement des Entérocbatéries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30°C

Milieu VRBG

Composition :

Peptone : 7g

Extrait de levure : 3g

Glucose : 10g

Chlorure de sodium : 5g

Violet cristal: 0,002g

Rouge neutre: 0,03g

Agar-agar : 13g

Mélange de sels biliaires : 1,5g

Ajuster à : pH 7,4

Eau : q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sont ensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spiral.

Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 30 °C en aérobiose pendant 18 à 24 heures.

Compter le nombre d'UFC

Annexe V

Dénombrement des levures par comptage

Milieu YGC

Composition :

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

Extrait de levure : 5,0g
D-(+)glucose : 20g
Agar-agar : 14,9g
Choramphénicol: 0,1g
Ajuster à: pH 6,6
Eau : q.s.p 1000 ml
Stérilisation
Les boîtes de Pétri sont ensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spiral.
Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 25 °C en aérobiose pendant 3 à 5 jours sans retourner les boîtes.
Compter le nombre de levures

Annexe VI

Dénombrement des moisissures par comptage

Milieu YGC
Composition :
Extrait de levure : 5,0g
D-(+)glucose : 20g
Agar-agar : 14,9g
Choramphénicol : 0,1g
Ajuster à : pH 6,6
Eau : q.s.p 1000 ml
Stérilisation
Les boîtes de Pétri sont ensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spiral.
Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 25 °C en aérobiose pendant 3 à 5 jours sans retourner les boîtes.
Compter le nombre de moisissures

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI
© OIV 2009