RÉSOLUTION OIV/OENO 368/2009

MONOGRAPHIE SUR LE CHITOSANE

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,

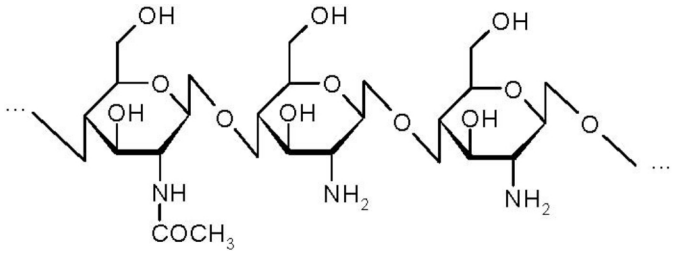
SUR PROPOSITION du groupe d'experts « Spécifications des produits oenologiques »

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

CHITOSANE

[C6H11NO4]n

Numéro CAS Chitosane: **[9012-76-4]**



Chitosane

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

A. Le chitosane est un polysaccharide préparé à partir d'une origine fongique . Il est extrait et purifié à partir de sources fongiques alimentaires ou biotechnologique sûres et abondantes tels que *Agaricus bisporus* ou *Aspergillus niger*. Le chitosane est obtenu par hydrolyse d'un extrait riche en chitine. La chitine est un polysaccharide composé de plusieurs unités N-acétyl-D-glucosamine reliées entre elles par une liaison de type ß (1,4). Le chitosane est constitué des unités sucres glucosamine (unités désacétylées) et d'unités N-acétyl-D-glucosamine (unités acétylées) reliées entre elles par des liaisons de type ß (1,4).

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

© OIV 2009

2. SYNONYMES

Poly(N-acetyl-D-glucosamine)-poly(D-glucose)

3. ETIQUETAGE

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

4. CARACTERES

4.1. Aspect et solubilité

Le chitosane se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche. La poudre 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 chitosane 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 %.

5. ESSAIS

5.1. Identification, du degré d'acétylation et de l'origine du chitosane

5.1.1. Détermination du degré d'acétylation

On détermine le degré d'acétylation par titration potentiométrique selon la méthode décrite en Annexe I.

5.1.2. Détermination de la source

Le chitosane, polymère naturel est extrait et purifié en partant de sources fongiques ; il est obtenu par hydrolyse d'un extrait riche en chitine. Ce chitosane est défini

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

© OIV 2009

comme identique au chitosane provenant de crustacés en termes de structures et de propriétés.

Une identification de l'origine du chitosane est faite par un ensemble de 3 caractéristiques: la teneur en glucanes résiduels (voir méthode en annexe II), la viscosité du chitosane en solution 1% et la densité tapée (après tassement).

Seul le chitosane d'origine fongique possède, à la fois, une teneur en glucanes résiduels > à 2%, une densité tapée ≥ à 0,7g/cm3 et une viscosité en solution 1% dans de l'acide acétique 1% < à 15 cPs.

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

Incinérer sans dépasser 600 °C le résidu laissé dans la détermination de la perte à la dessiccation décrit en 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 % en poids.

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 chitosane. L'échantillon de chitosane 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.

L'ensemble est alors soumis à une digestion par micro-ondes d'une puissance max de 1200 watt : 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.

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

© OIV 2009

5.5. Plomb

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

en annexe III.

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 Œnologique international

5.6. Mercure

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

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 Œnologique international

5.7. Arsenic

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

5.8. Cadmium

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

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 Œnologique international

5.9. Chrome

Le chrome est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III. 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 Œnologique international

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

© OIV 2009

5.10. Zinc

Le zinc est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décriteen annexe III.
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 Œnologique international

5.11. Fer

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

5.12. Cuivre

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

5.13. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE

5.13.1. 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 IV.

Moins de 1000 UFC/g de préparation.

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

5.13.2. Enterobactéries

Le dénombrement des Entérobactéries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30°C sur milieu VRBG décrite en annexe V. Moins de 10 UFC/g de préparation.

5.13.3. Salmonelles

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international Absence contrôlée sur un échantillon de 25g.

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

© OIV 2009

5.13.4. Coliformes

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international Moins de 100 UFC/g de préparation

5.13.5. Levures

Le dénombrement des Levures 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 Œnologique international

5.13.6. Moisissures

Le dénombrement des moisissures est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 25°C sur milieu YGC décrite en annexe VII. Moins de 100 UFC/g de préparation. Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international

6. RECHERCHE EN OCHRATOXINE A

Placer le chitosane en solution acqueuse (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

7. CONSERVATION

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

Annexe I

DETERMINATION DU DEGRE D'ACETYLATION

1. PRINCIPE

Le degré d'acétylation est le rapport du nombre d'unités N-acétyl-glucosamine sur le nombre de monomères totaux.

Cette méthode consiste à déterminer le degré d'acétylation du chitosane par titration

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

© OIV 2009

des groupes amines. Elle est basée sur les travaux de Rinaudo et al.,(1999) qui ont déterminé le pKa de la fraction amine libre du chitosane : pKa : 6,5.

Le chitosane est mis en solution dans un milieu acide, les groupements amines (sur les unités de glucosamine non acétylées (G)) sont chargées positivement (HCl en excès)).

Dans la première partie de la réaction, on détermine la quantité d'HCl en excès :

1.1. HCl (excès) + NaOH + (chit-NH_3)$^+Cl^-$ --> NaCl + H2O + (chit-NH_3)$^+Cl^-$

ensuite on détermine la quantité de groupements amines chargés :

1.2. (chit-NH_3)$^+Cl^-$ + NaOH --> chit-NH_2 + H_2O + NaCl

La différence entre les deux volumes de NaOH permet de connaître la quantité d'amines libres.

2. Réactifs et matériels

2.1. Préparation commerciale de chitosane

2.2. Eau distillée ou désionisée

2.3. Acide chlorhydrique 0,3 M

2.4. Hydroxyde de sodium 0,1M

2.5 Verrerie courante de laboratoire : vases cylindriques, pipettes, burette…

2.6. Agitateur magnétique et barreau aimanté

2.7. PHmètre avec sonde de température.

3. PREPARATION DES ECHANTILLONS

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

100 mg de chitosane (2.1) sont déposés dans un vase cylindrique auquel on ajoute 3 ml d'HCl 0,3 M (2.3) et 40 ml d'eau (2.2). Mettre en agitation pendant 12 heures (2.6).

4. MODE OPERATOIRE

Introduire l'électrode pH du pH-mètre (2.7) ainsi que la sonde de température dans le vase cylindrique. Vérifier que le pH de la solution de chitosane est inférieur à 3, sinon ajouter avec la pipette de l'HCl 0,3M (2.3).

Neutraliser l'HCl en excès l'aide de NaOH 0,1M (2.4) en afin d'obtenir un pH de l'ordre de 4,5 correspondant à pKa -2 de la fraction amines libres. Soit V1 ml le volume de

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

© OIV 2009

NaOH versé (réaction 1.1)

Continuer l'addition de NaOH (2.4) pour obtenir un pH de 8,5 correspondant à pKa +2 de la fraction amines libres. Soit V2 ml le volume de NaOH versé (réaction 1.2) (incluant le premier ajout V1)

Pour amener le milieu à pH 4,5, le volume V1 ml de NaOH 0,1M est généralement compris entre 3 et 4 ml.

Puis pour amener le milieu à pH 8,5, le volume total V2 ml de NaOH 0,1 M est généralement compris entre 8 et 9 ml.

Ces opérations peuvent être réalisées par titrage automatique.

5. EXPRESSION DES RESULTATS

Le degré d'acétylation du chitosane est exprimé en %. Cette formule est le rapport entre la masse d'unités de glucosamine acétylée (G^{a1}) en g dans l'échantillon sur la masse (G^{a2}) en g si tous les groupements étaient acétylés avec :

- **Q** = (V NaOH X 0,1) / (1000 X Mcs) = nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1g

Mcs : masse sèche de chitosane dans la prise d'essai, en g

- **VNaOH** = V2 - V1 = volume versé en ml de NaOH 0,1M entre pH 4,5 et pH 8,5.

Le facteur 1000 vient du fait que **VNaOH** est en ml

Soient G = partie Glucosamine et ^{a} = partie acétylée

G^{a1} = masse en g des unités de glucosamine acétylée réellement présentes dans l'échantillon

G^{a2} = masse en g des unités de glucosamine acétylée qu'il y aurait si tous les groupements étaient acétylés

Masse G^{a1} réellement présente (en g) = 1g- la masse de G

1g – (nombre de moles de groupements G par g) X masse moléculaire G (partie glucosamine)

- 1g - Q X 162

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

© OIV 2009

Masse G[a2] si tous les groupements non acétylés étaient acétylés (en g) = 1g + la masse des [a]

1g + (nombre de mole de groupements G par g) X masse moléculaire [a] (partie acétylée)

- 1g + Q X 43

Degré d'acétylation :

- **DA** = (1-162 X Q) / (1+ 43 X Q)

Bibliographie

1. Rinaudo, M., G. Pavlov and J. Desbrieres. 1999. Influenced of acetic acid concentration

on the solubilization of chitosan. *Polym.* 40, 7029-7032

Annexe II

DETERMINATION DE LA TENEUR EN GLUCANES RESIDUELS

1. PRINCIPE

Cette méthode consiste à déterminer la teneur en glucanes résiduels du chitosane par spectophotométrie.

Cette méthode est basée sur une réaction colorimétrique dont la réponse dépend de la dégradation des hydrates de carbone par l'acide sulfurique concentré chaud. Cette dégradation donne un composé jaune brun dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en glucanes résiduels.

2. REACTIFS et matériels

2.1. Glucane de pureté 97% (Société Mégazyme)

2.2. Préparation commerciale de chitosane

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

© OIV 2009

2.3. Eau distillée ou désionisée
2.4. Ethanol
2.5. Acide acétique 1%
2.6. Solution phénol 5%
2.7. Acide acétique glacial 100%
2.8. Verrerie courante de laboratoire : vase cylindriques, pipette, ballon jaugé,...
2.9. Agitateur magnétique et barreau aimanté
2.10. Chronomètre

3. PREPARATION DE LA GAMME ETALON

Une solution mère de glucanes est préparée suivant un protocole précis décrit ci-après :

- 500mg de glucanes (2.1) sont introduits dans une fiole jaugée de 100ml auquel on ajoute 6ml d'éthanol (2.4) et 80ml d'eau (2.3).
- Agiter et porter à ébullition pour permettre la dissolution des glucanes Laisser refroidir ajuster au trait de jauge avec de l'eau Laisser agiter 30 minutes.
- Prélever 1ml de cette solution dans une fiole jaugée de 50 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'acide acétique 1% (2.5). La solution est prête à l'emploi pour réaliser la gamme étalon suivant le protocole ci-après.

V sol mère (ml)	V eau (ml)	M glucanes (µg)
0	1	0
0,1	0,9	10
0,3	0,7	30
0,5	0,5	50
0,7	0,3	70

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

© OIV 2009

4. PREPARATION DES ECHANTILLONS

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

100mg de chitosane (2.2) sont déposés dans un ballon jaugé de 50ml auquel on ajoute 25ml d'acide acétique 1% (2.5).

Laisser agiter pendant 12 heures puis ajuster au trait de jauge.

5. MODE OPERATOIRE

Dans un tube à essai, ajouter 1ml de la solution échantillon à analyser, 1ml de phénol à 5% (2.6) et 5ml d'acide sulfurique concentré (2.7).

Agiter au vortex pendant 10 s puis laisser refroidir pendant 1heure.

L'absorbance est ensuite mesurée à 490nm.

6. EXPRESSION DES RESULTATS

L'absorbance est mesurée à 490nm. Le spectrophotomètre calcule la teneur en glucanes dans les échantillons à partir de la courbe de calibration (0-70 µg). Cette teneur s'exprime en µg/g de chitosane.

Annexe III

Dosage des métaux 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

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

© OIV 2009

chitosane. L'échantillon de chitosane 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. 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 IV

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

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

© OIV 2009

en spirale. Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 30 °C en aérobiose pendant 48 à 72 heures. Compter le nombre d'UFC

Annexe V

Dénombrement des Entérobactéries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage des colonies obtenus à 30°C

Milieu VRBG

Composition :

Peptone : 7g

Extrait de levure : 3g

Glucose: 10g

Chlorure de sodium: 5g

Agar-agar: 13g

Mélange de sels biliaires : 1,5g

Violet cristal : 0,002g

Rouge neutre : 0,03g

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

Compter le nombre d'UFC

Annexe VI

Dénombrement des levures par comptage

Milieu YGC

Composition :

Extrait de levure : 5,0g

D-(+)glucose: 20g

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

© OIV 2009

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
spirale. 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 VII

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
spirale. 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