RÉSOLUTION OENO 26/2004

MANNOPROTEINES DE LEVURES

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 de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DECIDE d'introduire dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts la méthode suivante:

MANNOPROTEINES DE LEVURES

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les mannoprotéines sont extraites de parois cellulaires de levures *Saccharomyces cerevisiae* par méthodes physico-chimiques ou enzymatiques.

Les mannoprotéines ont différentes structures selon leur masse moléculaire, leur degré et leur type de glycosylation et leur charge. Selon leur mode d'extraction, elles possédent différentes activités de stabilisation tartrique et/ou protéique des vins.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit indiquer le domaine d'application (stabilisation tartrique et/ou protéique des vins), les conditions de sécurité et de conservation ainsi que la date limite d'utilisation.

Pour les préparations en solution, la concentration en mannoprotéines, la teneur en dioxyde de soufre doivent également être indiquées.

3. CARACTERISATION

3.1. Les mannoprotéines se présentent soit sous une forme de poudre génèralement microgranulée de couleur blanche ou beige inodore, soit en solution colloïdale de couleur jaunâtre, translucide.

3.2. Les mannoprotéines sont solubles dans l'eau et insolubles dans l'éthanol. En

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

solution elles précipitent quand on rajoute 1 volume d'éthanol.

3.3. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire spécifique se mesure à 589 nm (raie D du sodium) et se rapporte à une solution de mannoprotéines de 10 g/l sous une longueur de 1dm.

Certaines mannoprotéines dont le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20°C}$ est compris entre 80 ° et 150° se distinguent de la gomme arabique dont le pouvoir rotatoire est inférieure à 50°.

D'autres préparations ne peuvent se différencier que par la composition centésimale en sucres (voir point 4.12)

4. ESSAIS

4.1. Perte à la dessiccation

4.1.1. Mannoprotéines en poudre :

Mettre 5 g de mannoprotéines dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre. Placer dans une étuve à 100-105 °C pendant 5 heures. La perte de poids ne doit pas être supérieure à 15 p.100.

4.1.2. Mannoprotéines en solution :

Placer 10 g de solution de mannoprotéines dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre. Porter sur un bain d'eau à 100 °C pendant 4 heures puis placer dans une étuve à 100-105 °C pendant 3 heures.

La quantité de résidu sec doit être d'au moins 10 p. 100.

Les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

4.2. Cendres

Incinérer le résidu sec à 550-600 °C. La teneur en cendres ne doit pas être supérieure à 8%.

4.3. Préparation de la solution pour essai

Préparer une solution de mannoprotéines à 10 g/l dans l'eau.

Dans le cas de solution de mannoprotéines, peser un poids correspondant à 5 g de résidu sec, évaporer presque à sec puis redissoudre à 10 g/l dans l'eau.

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

4.4. Métaux lourds

Sur la solution préparée pour essai (4.3) doser le fer selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Oenologique International

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

4.5. Plomb

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) doser le plomb selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique International

La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

4.6. Mercure

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) mais sans évaporer la solution doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique International

La teneur en mercure doit être inférieure à 0,15 mg/kg.

4.7. Arsenic

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) doser l'arsenic selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique International

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

4.8. Cadmium

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique International

La teneur en cadmium doit être inférieure à 0,5 mg/kg.

4.9. Azote total

Introduire 5 g de mannoprotéines dans un matras à minéralisation de 300 ml avec 15 ml d'acide sulfurique concentré (R) et 2 g de catalyseur de minéralisation (R). Continuer le dosage comme il est indiqué au chapitre II du Codex œnologique international.

Dans le cas de solution de mannoprotéines, peser un poids correspondant à 5 g de résidu sec, évaporer presque à sec puis continuer comme précédemment.

La teneur en azote doit être comprise entre 5 et 75 g/kg

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

4.10. Analyse microbiologiques

4.10.1. Flore mésophile aérobie totale

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Il faut moins de 10 000 germes totaux aérobies mésophiles dans 1 g.

4.10.2. Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Il faut moins de 10 UFC/g de préparation.

4.10.3. Staphylococcus aureus

Procéder au dénombrement selon une méthode à décrire au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Absence controlée de *Staphylococcus aureus* sur un échantillon de 1 g.

4.10.4. Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Absence controlée de salmonelles sur sur un échantillon de 25 g

4.10.5. Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Absence controlée *d'Escherichia coli* sur sur un échantillon de 25 g

4.10.6. Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Il faut moins de 10^4 UFC/g de préparation

4.10.7. Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Il faut moins de 50 UFC/g de préparation

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

4.10.8. Levures

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Il faut moins de 10^2 UFC/g de préparation

4.11. Polysaccharides

4.11.1. Principe :

Mesure de l'intensité de la coloration par le phénol à chaud, en milieu sulfurique.

4.11.2. Produits :

4.11.2.1. Solution de mannoprotéines à 15 mg/l

Dissoudre 150 mg de mannoprotéines dans 100 ml d'eau distillée, puis diluer cette solution au 1/100 avec de l'eau distillée.

4.11.2.2. Solution de phénol à 50 g/l

Dissoudre 5 g de phénol pur dans 100 ml d'eau distillée.

4.11.3. Protocole :

A 200 µl de solution à doser (4.11.2.1), sont ajoutés 200 µl de phénol (4.11.2.2) puis 1 ml d'acide sulfurique pur (R). Après agitation immédiate, les tubes sont portés dans un bain d'eau à 100°C pendant 5 minutes puis refroidis à 0 °C.

Après retour à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 490 nm. La solution de référence est une solution de mannose à 100 mg/l.

(Teneur en polysaccharides exprimée en équivalents mannose supérieure à 600 g/kg)

4.12. Composition centésimale en monomères glucidiques

4.12.1. Principe :

Dosage enzymatique du glucose et du mannose après hydrolyse acide.

Le dosage du mannose est réalisé à la suite de celui du fructose en ajoutant la phosphomannose isomérase (PMI).

4.12.2. Produits :

4.12.2.1. Solution de mannoprotéines à 5 g/l

Dissoudre 500 mg de mannoprotéines dans 100 ml d'eau distillée.

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

4.12.2.2. Solution d'acide sulfurique 5 M

Placer 28 ml d'acide sulfurique pur dans 100 ml d'eau distillée.

4.12.2.3. Solution d'hydroxyde de potassium 10 M

Dissoudre 46 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml d'eau distillée.

4.12.2.4. Phosphomannose isomérase 616 U/ml.

4.12.3. Protocole :

Placer 100 µl de solution à doser (4.12.2.1) dans des tubes à fermeture hermétique et ajouter 1ml d'acide sulfurique (4.12.2.2), après agitation , les tubes sont portés dans un bain d'eau à 100 °C pendant 30 minutes puis refroidis à 0 °C. Après retour à température ambiante, 1 ml d'hydroxyde de potassium est ajouté pour neutraliser le milieu.

Le dosage du glucose et du mannose peut alors être réalisé selon la méthode décrite au recueil.

Les mannoprotéines doivent contenir au moins 70% de mannose par rapport aux polysaccharides totaux déterminés en 4.11.

4.13. Test d'efficacité des mannoprotéines vis à vis des précipitations tartriques

4.13.1. Principe :

Détermination de la dose de mannoprotéines pour retarder la cristallisation de l'hydrogénotartrate de potassium dans une solution hydroalcoolique.

4.13.2. Produits :

Ac tartrique cristallisé : PM = 150,05

Ethanol à 95% volume

Chlorure de potassium : PM= 74,5

Hydrogénotartrate de potassium : PM= 188

4.13.3. Protocole :

4.13.3.1. Solution de mannoprotéines à 10 g/l

Dissoudre 1 g de mannoprotéines dans 100 ml d'eau distillée.

4.13.3.2. Matrice hydro-alcoolique

Dans une fiole jaugée de 1 litre remplie à moitié d'eau distillée dissoudre :

Acide tartrique : 2,1 g

Chlorure de potassium : 1,1 g

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

Ethanol à 95 % volume : 110 ml

Homogénéiser et compléter à l'eau distillée.

4.13.4. Test :

Placer dans 5 fioles jaugées de 100 ml des quantités croissantes de la solution de mannoprotéines (4.13.3.1) 0 – 1 – 2 – 3 - 4 ml compléter à 100 ml avec la matrice hydro-alcoolique (4.13.3.2). Ces quantités correspondront à des quantités finales de 0 – 100 – 200 – 300 - 400 mg/l de mannoprotéines.

Ajouter dans chaque fiole 100 mg d'hydrogénotartrate de potassium.

Placer dans un bain d'eau à 40 °C pendant 1 heure jusqu'à solubilisation complète de l'hydrogénotartrate de potassium.

Entreposer les fioles dans un réfrigérateur à 4 °C.

Observation au bout de 48 heures :

La fiole témoin contenant 0 ml de la solution de mannoprotéines (4.13.3.1) présente des cristaux d'hydrogénotartrate de potassium.

L'absence de cristaux dans les fioles contenant des mannoprotéines permettra d'apprécier leur efficacité. Dans tous les cas, les cristaux devront être absents dans la solution contenant 400 mg/l de mannoprotéines.

4.14. Test d'efficacité des mannoprotéines vis à vis des casses protéiques

4.14.1. Principe

Détermination de la dose de mannoprotéines pour améliorer la stabilisation protéique des vins.

4.14.2. Produit :

Sérum albumine bovine (Fraction V) (BSA)

4.14.3. Protocole :

4.14.3.1. Solution de sérum albumine bovine à 10 g/l

Dissoudre 2 g de sérum albumine bovine dans 200 ml d'eau distillée.

4.14.3.2. Solution de mannoprotéines à 20 g/l

Dissoudre 2 g de mannoprotéines dans 100 ml d'eau distillée.

4.14.4. Test

Placer 1 ml de la solution de BSA (4.14.3.1) dans 2 fioles jaugées de 100 ml compléter à

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

100 ml chaque fiole par un vin blanc sec ne présentant pas de trouble à la chaleur (ou stabilisé si nécessaire par traitement à la bentonite à la dose adéquate), homogénéiser.

Ajouter 0 et 1ml de la solution de mannoprotéines (4.14.3.2) homogénéiser. Ces quantités correspondront à des doses finales de 0 et 200 mg/l de mannoprotéines.

Filtrer sur membrane dont le diamètre des pores est de 0,45 µm les solutions témoin et traitée. Placer les solutions filtrées dans 2 fioles de 50 ml.

Placer les 2 fioles de 50 ml dans un bain d'eau à 80 °C pendant 30 minutes. Laisser refoidir à température ambiante pendant 45 minutes, mesurer la turbidité des solutions témoin et traitée.

La diminution de turbidité entre l'échantillon témoin et l'échantillon traité doit être au moins de 50%.

4.15. Dosage dans les vins

4.15.1. Principe

Le dosage des mannoprotéines dans les vins peut être réalisé après précipitation à l'ethanol (5 volumes), hydrolyse acide du précipité et dosage du mannose libéré selon la méthode figurant en annexe.

5. CONSERVATION

Les mannoprotéines solides ont une durée de conservation supérieure à 2 ans si elles sont stockées à l'abri de l'humidité, dans un emballage clos et dans des locaux tempérés.

Les mannoprotéines présentées en solutions colloïdales prêtes à l'emploi doivent être stockées en récipient hermétiquement clos.

Annexe

Dosage du mannose par méthode enzymatique

1. Principe

Le mannose est phosphorylé comme le glucose et le fructose :

Mannose + ATP ⟶ M6P + ADP

Après dosage du glucose et du fructose, le mannose–6-phosphate est transformé sous

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

l'action de la phosphomannose isomérase (PMI) en fructose-6-phosphate.

M-6-P $\xrightarrow{PMI}$ F-6-P

Le fructose-6-phosphate a nouveau formé est transformé comme précédemment en glucose-6-phosphate qui est dosé.

2. Protocole

Placer 5 ml de vin dans un tube à centrifuger et ajouter 25 ml d'ethanol à 95%, après agitation les tubes sont placés 12 Heures au refrigérateur à 4°C. Le précipité formé est récupéré par centrifugation, laver par 2 fois 10 ml d'ethanol à 95%. L'hydrolyse du précipité et le dosage du mannose est réalisé comme en 4.12.

Ce dosage ne permettra pas de différencier les mannoprotéines ajoutées des mannoprotéines naturelles.

3. Réactif additionnel par rapport à la méthode du recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts

Solution 6 : phosphomannose isomérase (616 U/ml).

La suspension est utilisée sans dilution.

4. Dosage

Après mesure de A_3 suivant la méthode du recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, ajouter

	Référence	Détermination
Solution 6	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger ; effectuer la mesure au bout de 30 min ; vérifier l'arrêt de la réaction après 2 min. (A_4)

Déterminer les différences d'absorbance :

$A_4 - A_3$ correspondant au mannose.

Pour le témoin et le dosage.

Déduire la différence d'absorbance pour le témoin (ΔA_T) de celle du dosage (ΔA_D) et établir

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

Pour le mannose : $\Delta A_M = \Delta A_D - \Delta A_T$

5. Expression des résultats

On obtient

Pour le mannose : $Cg/l = 0,423 \times \Delta A_M$

Remarque : Si les mesures ont été faites aux longueurs d'onde 334 ou 365 nm , on obtient :

Mesure à 334 nm :

Pour le mannose : $Cg/l = 0,430 \times \Delta A_M$

Mesure à 365 nm

Pour le mannose : $Cg/l = 0,783 \times \Delta A_M$

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004