Codex œnologique international

ORGANISATION INTERNATIONALE
DE LA VIGNE ET DU VIN

www.oiv.int

Codex *œnologique* international

ÉDITION 2026

INCLUS

Résolutions adoptées à Chișinău (Moldavie)

23e Assemblée générale · 20 juin 2025

OIV
1, Rue Monge · 21000 Dijon · France
Tél. +33 (0)1 44 94 80 80
contact@oiv.int · www.oiv.int

Imprimé à Dijon (France)
Dépôt légal Novembre 2026
ISBN 978-2-85038-135-5

Table des matières

Édition 2026

Avant-propos

CHAPITRE I

Produits utilisés en œnologie

N°	Monographie / Méthode	Fiche
1	Principes généraux	COEI-1-GENPRI: 2022
2	Acide alginique	COEI-1-ACALGI: 2010
3	Chlorure d'ammonium	COEI-1-AMMCHL: 2007
4	Hydrogénosulfite d'ammonium	COEI-1-AMMHYD: 2007
5	Sulfate d'ammonium	COEI-1-AMMSUL: 2000
6	Agents antimousse	COEI-1-ACIGRA: 2000
7	Argon	COEI-1-ARGON: 2004
8	Acide ascorbique	COEI-1-ASCACI: 2007
9	Bactéries lactiques	COEI-1-BALACT: 2012
10	Bentonites	COEI-1-BENTON: 2011
11	Bêta-glucanase	COEI-1-BGLUCA: 2004
12	Carbonate de calcium	COEI-1-CALCAR: 2007
13	Phytate de calcium	COEI-1-CALPHY: 2000
14	Tartrate de calcium	COEI-1-CALTAR: 2000
15	Sulfate de calcium	COEI-1-CALSUL: 2020
16	Caramel	COEI-1-CARAME: 2004
17	Dioxyde de carbone	COEI-1-DIOCAR: 2000
18	Caséines	COEI-1-CASEIN: 2015
19	Résines échangeuses de cations	COEI-1-RESECA: 2000
20	Charbon œnologique	COEI-1-CHARBO: 2018
21	Carboxyméthylcellulose (gomme de cellulose, CMC)	COEI-1-CMC: 2009
22	Cellulose	COEI-1-CELLUL: 2002
23	Cellulose en poudre	COEI-1-POWCEL: 2022
24	Chitine-glucane	COEI-1-CHITGL: 2009
25	Chitosane	COEI-1-CHITOS: 2025
26	Acide citrique, monohydrate	COEI-1-CITACI: 2000

N°	Monographie / Méthode	Fiche
27	Solution colloïdale de dioxyde de silicium	COEI-1-DIOSIL: 2019
28	Sulfate de cuivre, pentahydrate	COEI-1-CUISUL: 2000
29	Citrate de cuivre	COEI-1-CUICIT: 2011
30	Acide D,L-tartrique	COEI-1-DLTART: 2013
31	Hydrogénophosphate de diammonium	COEI-1-PHODIA: 2000
32	Diatomite	COEI-1-DIATOM: 2002
33	Dicarbonate de diméthyle	COEI-1-DMDC: 2007
34	Albumine d'œuf	COEI-1-OEUALB: 2019
35	Membranes d'électrodialyse	COEI-1-MEMELE: 2000
36	Membranes bipolaires d'électrodialyse	COEI-1-MEMBIP: 2011
ENZYMES		
37	Préparations enzymatiques	COEI-1-PRENZY: 2012
38	Activité arabinanase	COEI-1-ACTARA: 2012
39	Activité xylanase	COEI-1-XYLANA: 2018
40	Activité bêta-glucanase (β 1-3, β 1-6)	COEI-1-ACTGLU: 2013
41	Activité cinnamoyl estérase	COEI-1-CINEST: 2013
42	Cellulase	COEI-1-ACTCEL: 2012
43	Glycosidase	COEI-1-GLYCOS: 2012
44	Activité pectinelyase	COEI-1-ACTPLY: 2012
45	Activité polygalacturonase	COEI-1-ACTPGA: 2012
46	Protéases (aspergillopepsine I)	COEI-1-PROTEA: 2021
47	Activité pectine méthylestérase	COEI-1-ACTPME: 2012
48	Uréase	COEI-1-UREASE: 2005
49	Colle de poisson	COEI-1-COLPOI: 2000
50	Plaques de filtration	COEI-1-PLAQFI: 2021
51	Gélatine	COEI-1-GELATI: 2003
52	Glutathion	COEI-1-GLUTAT: 2017
53	Sucre de raisin	COEI-1-SUCRAI: 2012
54	Gomme arabique	COEI-1-GOMARA: 2000
55	Kaolin	COEI-1-KAOLIN: 2000
56	Levures inactivées	COEI-1-LEVINA: 2024
57	Levures inactivées (glutathion)	COEI-1-LEVGLU: 2018
58	Acide L(+)-tartrique	COEI-1-LTARAC: 2025
59	Acide lactique	COEI-1-ACILAC: 2007
60	Dioxyde de soufre liquide	COEI-1-SOUDIO: 2000

N°	Monographie / Méthode	Fiche
61	Lysozyme	COEI-1-LYSOZY: 2007
62	Acide malique	COEI-1-ACIMAL: 2004
63	Acide métatartrique	COEI-1-METACI: 2000
64	Cellulose microcristalline	COEI-1-CELMIC: 2002
65	Membranes de nanofiltration	COEI-1-MEMNAN: 2013
66	Azote	COEI-1-AZOTE: 2000
TANINS ŒNOLOGIQUES		
67	Tanins œnologiques	COEI-1-TANINS: 2022
68	Tanins de procyanidines/prodelphinidines	COEI-1-PROCYA: 2022
69	Ellagitanins	COEI-1-ELLAGI: 2022
70	Tanins galliques	COEI-1-GALLOT: 2022
71	Tanins de profisetinidines/prorobinetinidines	COEI-1-PROFIS: 2022
72	Oxygène	COEI-1-OXYGEN: 2004
73	Perlite	COEI-1-PERLIT: 2003
74	Polyvinylimidazole/polyvinylpyrrolidone (PVI/PVP)	COEI-1-PVIPVP: 2017
75	Polyvinylpolypyrrolidone	COEI-1-PVPP: 2007
76	Polyaspartate de potassium	COEI-1-POTPOL: 2020
77	Alginate de potassium	COEI-1-POTALG: 2010
78	Anhydrosulfite de potassium	COEI-1-POTANH: 2000
79	Carbonate de potassium	COEI-1-POTCAR: 2018
80	Caséinate de potassium	COEI-1-POTCAS: 2021
81	D,L-tartrate de potassium	COEI-1-POTRAC: 2000
82	Hexacyanoferrate (II) de potassium	COEI-1-POTFER: 2000
83	Hydrogénocarbonate de potassium	COEI-1-POTBIC: 2000
84	Hydrogénosulfite de potassium	COEI-1-POTBIS: 2019
85	Hydrogénotartrate de potassium	COEI-1-POTBIT: 2000
86	Sorbate de potassium	COEI-1-POTSOR: 2000
87	L(+)-tartrate de potassium	COEI-1-POTTAR: 2000
88	Protéines d'origine végétale	COEI-1-PROVEG: 2024
89	Alcool rectifié d'origine agricole	COEI-1-ALCAGR: 2000
90	Alcool rectifié d'origine vitivinicole	COEI-1-ALCVIT: 2000
91	Membranes d'osmose inverse	COEI-1-MEMOSM: 2000
92	Fibres végétales sélectives	COEI-1-FIBVEG: 2017
93	Acide fumarique	COEI-1-FUMARI: 2023
94	Acide sorbique	COEI-1-SORACI: 2007

N°	Monographie / Méthode	Fiche
95	Chlorure d'argent	COEI-1-CHLARG: 2014
96	Lait écrémé	COEI-1-LAIECR: 2008
97	Billes de styrène-divinylbenzène	COEI-1-STYDVB: 2020
98	Chlorhydrate de thiamine	COEI-1-THIAMIN: 2000
99	Membranes d'ultrafiltration	COEI-1-MEMULT: 2013
100	Morceaux de bois de chêne	COEI-1-BOIMOR: 2010
101	Bois des récipients vinaires	COEI-1-BOIREC: 2005
102	Levures sélectionnées Saccharomyces spp.	COEI-1-SACCHA: 2017
103	Levures sélectionnées non-Saccharomyces spp.	COEI-1-NOSACC: 2017
104	Mannoprotéines de levures	COEI-1-MANPRO: 2024
105	Extraits protéiques de levures	COEI-1-EPLEV: 2024
106	Autolysats de levures	COEI-1-AUTLYS: 2024
107	Enveloppes cellulaires de levures	COEI-1-ECOLEV: 2024
108	Zéolithe Y-faujasite	COEI-1-ZEOLIT: 2016

En cours de révision (version française uniquement) : Alginate de sodium – COEI-V-1-SODALG, édition 1978.

CHAPITRE II

Techniques analytiques et de contrôle

N°	Monographie / Méthode	Fiche
109	5-(Hydroxyméthyl)furfural – dosage	COEI-2-HMF: 2003
110	Arsenic – dosage par SAA	COEI-2-ARSENI: 2003
111	Contrôles bactériologiques	COEI-2-CONBAC: 2021
112	Benzo[a]pyrène – dosage	COEI-2-HYDCAR: 2003
113	Amines biogènes – détection par CCM	COEI-2-AMIBIO: 2010
114	Indice de brome	COEI-2-BROME: 2003
115	Cadmium – dosage par SAA	COEI-2-CADMIU: 2003
116	Calcium – dosage par SAA	COEI-2-CALCIU: 2003
117	Chlorures – recherche	COEI-2-CHLORU: 2003
118	Chrome – dosage par SAA	COEI-2-CHROME: 2003
119	Cendres sulfuriques totales	COEI-2-CENDRE: 2003
120	Cuivre – dosage par SAA	COEI-2-CUIVRE: 2003
121	Contrôle des gaz par CPG	COEI-2-CONGAZ: 2003
122	Métaux lourds – recherche	COEI-2-METAUX: 2003
123	Fer – dosage par SAA	COEI-2-FER: 2003

N°	Monographie / Méthode	Fiche
124	Plomb – dosage par SAA	COEI-2-PLOMB: 2003
125	Mercure – dosage	COEI-2-MERCUR: 2003
126	Méthodes de minéralisation avant dosage par SAA	COEI-2-MINERA: 2003
127	Nickel – dosage par SAA	COEI-2-NICKEL: 2003
128	Potassium – dosage par SAA	COEI-2-POTASS: 2003
129	Capacité d'une préparation enzymatique à couper les chaînes pectiques – méthode viscosimétrique	COEI-2-VISCPE: 2009
130	Saccharose (sucre de raisin) – dosage	COEI-2-SUCSAC: 2003
131	Sélénium – dosage par SAA	COEI-2-SELENI: 2003
132	Sodium – dosage par SAA	COEI-2-SODIUM: 2003
133	Sulfates – recherche	COEI-2-SULFAT: 2003
134	Tantalisation des plates-formes	COEI-2-TANTAL: 2003
135	Azote total – dosage	COEI-2-AZOTOT: 2003
136	Comptage des cellules de levures par cytométrie en flux	COEI-2-CYTFLO: 2025
137	Zinc – dosage par SAA	COEI-2-ZINC: 2003

CHAPITRE III

Réactifs et solutions titrées

N°	Monographie / Méthode	Fiche
138	Réactifs et solutions titrées	COEI-3-REASOL: 2003

Avertissement:

L'OIV, en 2000, a adopté 40 monographies de produits utilisés en œnologie qui constituent la nouvelle édition de **Codex Œnologique International** et qui figurent dans ce classeur sur papier blanc.

Cette contribution scientifique importante se poursuit afin de mettre à jour les anciennes monographies restantes ou d'en ajouter de nouvelles pour être en adéquation avec les fiches du **Code International des Pratiques Œnologiques.**

Par ailleurs, la Sous-Commission d'Unification des Méthodes d'Analyse et d'Appréciation des Vins de l'OIV qui a en charge la révision du Codex Œnologique International, a également engagé le travail de révision de du chapitre II "techniques analytiques et de contrôle" et du chapitre III "Réactifs et solutions titrées". Ce travail a ainsi abouti à l'adoption en 2003 de nouvelles monographies des chapitres concernés.

Introduction

Le **Codex Œnologique International** réunit les descriptions des principaux produits chimiques, organiques ou gaz utilisés dans l'élaboration et la conservation des vins.

Les conditions de leur emploi, le mode et les limites de leur utilisation sont fixés par le **Code International des Pratiques Œnologiques**. L'autorisation de leur emploi relève des législations nationales.

En revanche, les caractères d'identification et le degré de pureté de ces produits sont ici décrits et précisés, ainsi que l'efficacité minimale exigée pour pouvoir être qualifiés *"conforme au Codex œnologique International"* .

D'autre part, la définition ou la formule, avec l'éventuelle synonymie, de chaque produit sont donnés. Le poids moléculaire, les caractères généraux, en particulier les solubilités, sont également rappelés, et pour éviter toute erreur, des moyens simples d'identification sont indiqués.

Chaque monographie indique les recherches à effectuer pour déceler et doser les impuretés et leur limites admissibles. Ces limites ont toutefois été fixées pour certaines d'entre elles:

- le sélénium, l'arsenic, les métaux lourds, etc., afin d'empêcher les produits œnologiques, compte tenu de la dose maximale de leur emploi, d'apporter le moindre effet toxique,
- le fer, le cuivre, le calcium, afin d'éviter tout effet nuisible à la qualité du vin et à son aspect.

Quant aux teneurs de certains autres produits tels que les chlorures, le sodium, les sulfates, etc., elles ont été fixées assez larges, car ces produits ne sont pas toxiques et les vins en contiennent naturellement des quantités supérieures à celles qu'apportent éventuellement les produits œnologiques.

Remarque générale: les solubilités sont, sauf indication contraire, exprimées à 20

°C en grammes de solvant pour un gramme de produit.

Chapitre I

Produits utilisés en œnologie

PRINCIPES GÉNÉRAUX À PRENDRE EN COMPTE DANS L'ÉVALUATION DES PRATIQUES ŒNOLOGIQUES ET DES SUBSTANCES COMPOSANT DES PRODUITS ŒNOLOGIQUES

(OIV-OENO 602-2022)

Les pratiques œnologiques:

- sont des pratiques biologiques, physiques et chimiques sûres destinées à la production et à la conservation de produits vitivinicoles,
- préservent les caractéristiques naturelles et essentielles et la composition du vin,
- ne doivent pas engendrer de confusion chez le consommateur, ni faciliter celle-ci.

(Chaque fois que cela s'avère possible et raisonnable, il convient de privilégier les substances extraites du raisin/les substances d'origine vitivinicole.)
Les pratiques œnologiques et l'utilisation de substances œnologiques ne doivent pas masquer les effets de l'emploi de matières premières défectueuses ou de pratiques non hygiéniques[1].

Dans cette optique, l'OIV établit une description spécifique de chaque pratique œnologique et de toute utilisation de substances œnologiques, incluant ses objectifs, buts et conditions d'utilisation. Les pratiques œnologiques et les substances œnologiques recommandées et publiées par l'OIV ne doivent donc être utilisées que pour les buts décrits et de la manière décrite pour servir de référence pour de bonnes pratiques de fabrication.

Les pratiques œnologiques et substances œnologiques sont utilisées :

- pour prévenir ou éliminer les défauts du vin (oxydation, contamination bactérienne, précipitation tartrique, etc.),
- pour améliorer le processus de vinification (maîtrise des fermentations, amélioration de la filtrabilité, de la clarification, etc.),
- pour accroître la capacité de conservation ou de stabilité du produit vitivinicole et le maintien de ses qualités organoleptiques,
- comme additifs ou auxiliaires technologiques, le statut de la substance dépendant de son utilisation.

[1] On entend par « hygiène » les mesures et conditions nécessaires pour maîtriser les dangers et garantir le caractère propre à la consommation humaine du vin, des boissons à base de vin, des raisins de table, des raisins secs et autres produits d'origine vitivinicole, compte tenu de l'utilisation prévue.

Il existe une nécessité technologique suffisante pour justifier l'utilisation de la substance œnologique, ou le traitement présente des avantages économiques ou techniques flagrants par rapport aux pratiques actuelles, et les consommateurs ne sont pas induits en erreur par l'utilisation du produit de traitement œnologique. La substance œnologique procure des avantages aux consommateurs et, par conséquent, répond à un ou plusieurs objectifs, tels que :

- conserver la qualité nutritive des produits vitivinicoles,
- accroître la capacité de conservation ou la stabilité du produit vitivinicole et maintenir ses qualités organoleptiques.

L'OIV établit pour chaque substance œnologique une spécification concernant l'origine, la pureté et d'autres indications nécessaires.

L'OIV évalue et développe de nouvelles pratiques œnologiques ou révise celles existantes en prenant également en compte leur impact et leur durabilité environnemental en fonction des innovations technologiques.

L'OIV recommande que :

- la quantité de produit de traitement œnologique additionnée lors de l'élaboration d'un produit soit limitée à la teneur la plus faible possible requise pour obtenir l'effet désiré,
- la quantité d'un produit de traitement œnologique qui, suite à son utilisation, se transforme en un autre produit non destiné à accomplir une fonction physique ou une autre fonction technique au sein du produit vitivinicole lui-même, soit réduite autant que raisonnablement possible.

L'OIV recommande des doses numériques maximales pour l'emploi des substances œnologiques, avec une dose journalière admissible (DJA) établie par le JECFA ou une autre autorité de sécurité alimentaire, en tenant également compte de l'avis de son Groupe « Sécurité alimentaire ». L'OIV recommande également des limites numériques en vue du meilleur usage de la fonction technologique et/ou aux fins de la qualité, en se fondant sur des données expérimentales analysées par ses propres experts. En l'absence de limite numérique fixée par l'OIV, elle recommande alors que les substances œnologiques soient employées à des teneurs établies pour les bonnes pratiques de fabrication (BPF), correspondant à la teneur la plus faible possible requise pour accomplir la fonction technologique requise.

ACIDE ALGINIQUE
N° sin 400
N° C.A.S.: 9005-32-7
(Oeno 6/2005, Oeno 410/2010)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'acide alginique est un polysaccharide colloïdal extrait de diverses variétés d'algues brunes en particulier de Laminaria. Il a pour monomères constituitifs de l'acide α-L-glucuronique et β-D-mannuronique liés par paire selon des liaisons de type $1\rightarrow4$

$$\rightarrow\textbf{4-[}\alpha\textbf{-glu-1}\rightarrow\textbf{4-}\alpha\textbf{-glu-1}\rightarrow\textbf{4-}\beta\textbf{-man-1}\rightarrow\textbf{4-}\beta\textbf{-man-1]}_n\rightarrow\textbf{4-}\alpha\textbf{-glu}$$

Agent clarifiant qui, après avoir été neutralisé avant usage par du chlorure de potassium ou du carbonate de potassium ou de l'hydrogénocarbonate de potassium peut entrer dans la liqueur de tirage destinée à effectuer la seconde fermentation des vins mousseux (prise de mousse).
l'acide alginique est constitué en moyenne de 200 unités de base d'acides uroniques.
Poids moléculaire compris entre 10 000 et 600 000 U.

2. ETIQUETAGE

La concentration de l'acide alginique doit être indiquée sur l'étiquette, ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

l'acide alginique se présente en poudre ou filaments ou encore de granulés de couleur blanc jaunâtre à brune, amorphe, insoluble dans l'eau pure et les divers solvants organiques. Il peut se dissoudre dans l'eau alcalinisée par du carbonate de sodium de l'hydroxyde de sodium ou phosphate trisodique.

4. CARACTERES D'IDENTITE

4.1 pH

Une suspension de l'acide alginique à 3 % dans l'eau présente un pH compris entre 2 et 3,5.

4.2 Différenciation des autres polysaccharides

Une solution d'acide alginique à 5 g/l dans de l'hydroxyde de sodium (dissoudre 4,3 g d'hydroxyde de sodium dans de l'eau et compléter à 100 ml) précipite sous forme gélatineuse par addition d'un cinquième de volume d'une solution de chlorure de calcium à 2.5 %.
Par ailleurs une addition de un demi volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à la solution précédemment décrite n'entraîne aucun trouble.
Ces deux tests permettent de différencier l'acide alginique des autres polysaccharides pouvant-être utilisés dans les produits alimentaires ou pharmaceutiques.

4.3 Caractères organoleptiques

L'acide alginique doit être sans saveur, ni odeur anormale.

5. ESSAIS

Toutes les limites décrites ci-dessous se rapportent au poids sec d'acide alginique.

5.1 Insolubles dans une solution d'hydroxyde de sodium

Dissoudre par agitation magnétique prolongée 1 g d'acide alginique pesé avec précision dans 100 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (dissoudre 4,3 g d'hydroxyde de sodium dans de l'eau et compléter à 100 ml) centrifuger, décanter, laver le culot avec de l'eau distillée à 5 reprises avec à chaque fois centrifugation et élimination de l'eau de lavage. Transférer le culot en totalité à l'aide d'eau distillée dans un filtre de Gooch préalablement taré (filtre en verre fritté de faible porosité), sécher 1 heure à 105 °C et peser de nouveau.
Le taux d'insoluble ne doit pas dépasser 2 % par rapport au poids sec de l'acide alginique.

5.2 Perte à la dessiccation

Déterminée jusqu'à poids constant, sur une prise d'essai de 2 g, la perte de poids, à 100-105°C, de l'acide alginique doit être inférieure à 15 p. 100

5.3 Cendres sulfuriques

Procéder comme il est décrit dans le chapitre II du Codex œnologique international. Le taux de cendres sulfuriques ne doit pas être supérieur à 8 p 100 en poids d'acide alginique.

5.4 Préparation de la solution pour essais
Après la pesée des cendres, les dissoudre dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau. Chauffer pour activer la dissolution et ajouter de l'eau jusqu'à obtention d'un volume égal à 25 fois le poids d'acide alginique sec. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0,04 g d'acide alginique sec.

5.5 Plomb
Sur la solution préparée pour essais (5.4), effectuer le dosage du plomb selon la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

5.6 Cadmium
Sur la solution préparée pour essais (5.4), effectuer le dosage du cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.7 Mercure
Effectuer le dosage du mercure à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.8 Arsenic
Sur la solution préparée pour essais (5.4), effectuer le dosage de l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

5.9 Contrôle bactériologique
Pour chaque paramètre, procéder comme il est indiqué au chapitre II du Codex Œnologique international.
Limite : micro-organismes viables totaux : moins de 5×10^3 UFC/g.

5.10 Coliformes
Le nombre de coliformes doit être inférieur ou égal à 1 par g.

5.11 Staphylocoques
Le nombre en staphylocoques (ß-hémolytiques à coagulase positive) doit être inférieur ou égal à 1 par g.

5.12 Salmonelles

Le nombre de salmonelles doit être inférieur à 1 pour 100 g.

5.13 Levures
Teneur limite : 5 x 10^2 UFC par g de préparation.

5.14 Bactéries lactiques
Teneur limite : 10^2 UFC par g de préparation.

5.15 ***Lactobacillus sp.***
Teneur limite : 10 UFC par g de préparation.

5.16 ***Pediococcus sp.***
Teneur limite : absence dans un échantillon de 10 g de préparation.

5.17 Bactéries acétiques
Teneur limite : 10^3 UFC par g de préparation.

5.18 Moisissures
Teneur limite **:** 5 X 10^2 UFC par g de préparation.

6. CONSERVATION

L'acide alginique doit être conservé dans des sacs étanches.

CALCIUM (ALGINATE DE)
N° SIN: 402

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'alginate de calcium est obtenu à partir d'une solution aqueuse d'alginate de potassium ou d'acide alginique à 1 pour 100 mis en contact avec une solution aqueuse de chlorure de calcium à 20 pour100. La production de billes d'alginate de calcium s'obtient en laissant tomber des gouttes de solution d'alginate de potassium dans une solution de chlorure de calcium.
Les billes d'alginate de calcium, sèches ou humides, peuvent contenir des levures ou des bactéries lactiques, sèches ou humides. Elles servent à la prise de mousse en bouteille des vins mousseux ou à relancer la fermentation alcoolique des vins tranquilles ou a déclencher la fermentation malolactique.
Ces billes peuvent être recouvertes d'une double couche d'alginate de potassium ou de calcium ou de silice colloïdale afin d'éviter le relargage des levures ou des bactéries incluses.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté et les conditions de sécurité et de conservation de l'alginate de calcium, les levures ou des bactéries incluses dans les billes, la date de péremption et le numéro du lot.

3. CARACTERES

L'alginate de calcium se présente sous forme d'un gel translucide, insoluble dans l'eau et le vin. Il se dissout seulement dans une solution de métaphosphate de sodium.
Il donnera également un précipité d'acide alginique si, à 10 ml de suspension aqueuse d'alginate de calcium à 1 pour100 (m/v), on ajoute 1 ml d'acide sulfurique dilué à 10 pour100 (R).

AMMONIUM (CHLORURE D')

Chlorhydrate d'ammoniac

Ammonii Chloridum

NH_4Cl = 53,50

N° SIN: 510

(Oeno 13/2000 modifiée par Oeno 4/2007)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit employé en tant qu'activateur de fermentation, réservé aux opérations fermentaires. Il apporte l'ion ammonium directement assimilable par les levures.

Il existe des limites réglementaires concernant l'apport d'ammonium.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange, ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

Cl	66,22
NH_3	31,78
N	28,17

4. CARACTERES

Cristaux incolores, inodores, de saveur fraîche, piquante et salée; se sublimant sans décomposition, inaltérables à l'air.

5. SOLUBILITE

Eau à 20°C	350,8 g/l
Eau à 100°C	758 g/l
Alcool à 95 % vol.	13,3 g/l

6. CARACTERES D'IDENTITE

La solution aqueuse de chlorure d'ammonium donne les réactions de l'ammonium et celles des chlorures.

7. ESSAIS

7.1 Cendres sulfuriques

Le taux de cendres sulfuriques du chlorure d'ammonium, déterminé comme il est indiqué en annexe, ne doit pas être supérieur à 0,2 p. 100.

7.2 Préparation de la solution pour essais

Préparer une solution aqueuse à partir de cristaux de NH_4Cl à 10 p. 100 (m/v).

7.3 Sulfates

A 1 ml de la solution préparée pour essais (7.2), ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (m/v). (R), 17 ml d'eau et 2 ml de solution de chlorure de baryum (R). Le mélange doit être limpide, ou l'opalescence observée après 15 minutes doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en sulfates exprimée en acide sulfurique, inférieure à 1g/kg).

7.4 Nitrates

Mélanger dans un tube à essais 5 ml d'acide sulfurique concentré (R) et 0,5 ml de solution de sulfate de fer(II) à 5 p. 100 (m/v) préparée extemporanément. Verser, sans mélanger, 5 ml de la solution préparée pour essais (7.2), on ne doit observer aucune coloration à la surface de séparation des deux solutions.

7.5 Phosphates

A 0,5 ml de la solution préparée pour essais (7.2), ajouter 5 ml d'eau, 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique (R). Laisser en contact 15 minutes à 20°C. Si une coloration jaune apparaît, elle doit être inférieure à celle obtenue en ajoutant à 0,5 ml d'une solution à 0,05 g de phosphore par litre (R), 5 ml d'eau et 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique (R). (Teneur en phosphates exprimée en phosphore, inférieure à 500 mg/kg).

7.6 Fer

A 5 ml de la solution préparée pour essais (7.2), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), une goutte de permanganate de potassium à 2 p. 100 (R) et 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

Si une coloration rouge apparaît, elle devra être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 2,5 ml de solution de fer(III) à 0,01 g de fer par litre (R), 2,5 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur en fer inférieure à 50 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

7.7 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (7.2), rechercher 1'arsenic par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

7.8 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (7.2), doser le plomb selon la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 2 mg/kg).

7.9 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (7.2) rechercher le mercure par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

7.10 Dosage de 1'ammoniac

Diluer au dixième la solution préparée pour essais (7.2) et introduire 10 ml de cette dilution (soit 0,1 g de chlorure d'ammonium) dans un appareil à entraînement à la vapeur d'eau et ajouter 10 ml d'hydroxyde de sodium à 30 % (R) et distiller 100 ml. Doser l'ammoniac distillé par l'acide chlorhydrique 0,1 M. Soit **n**, le nombre de millilitres versés :

100 g de chlorure d'ammonium contiennent 1,7 **n** g d'ammoniac (NH_3). (Teneur en ammoniac supérieure à 31,5 p. 100)

7.11 Dosage de 1'acide chlorhydrique

Prélever 10 ml de la solution préparée pour essais (7.2) et diluée au dixième et les placer dans un vase cylindrique ; ajouter 20 ml de nitrate d'argent en solution 0,1 M, 1 ml d'acide nitrique concentré (R), 5 ml de solution de sulfate de fer(III) et d'ammonium à 10 p. 100 (R). Titrer l'excès de nitrate d'argent par une solution de thiocyanate de potassium 0,1 M: soit **n** millilitres versés.

100 g de chlorure d'ammonium contiennent 3,65 (20-**n**) g d'acide chlorhydrique (HCl). (Teneur en acide chlorhydrique supérieure à 67,5 p. 100).

8. CONSERVATION

Le chlorure d'ammonium doit être conservé dans des récipients étanches et à l'abri de la chaleur.

AMMONIUM (HYDROGENOSULFITE D')
Bisulfite d'ammonium
NH_4HSO_3 = 99,07

(Oeno 14/2000 modifiée par Oeno 3/2007)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit de la catégorie des agents conservateurs, réservé aux opérations fermentaires. Il apporte du dioxyde de soufre et l'ion ammonium directement assimilable par les levures.
Il existe des limites réglementaires concernant l'apport d'ammonium et la teneur en dioxyde de soufre.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

NH_3	17,16
SO_2	64,67

4. CARACTERES

L'hydrogénosulfite d'ammonium est toujours présenté sous forme de solution aqueuse. Cette solution libère une odeur piquante de dioxyde de soufre.

5. SOLUBILITE

Eau à 60°C	847 g/l
Alcool à 95 % vol.	faiblement soluble

6. CARACTERES D'IDENTITE

La solution aqueuse d'hydrogénosulfite d'ammonium donne les réactions de l'ammonium (dégagement d'ammoniac en présence d'hydroxyde de sodium à chaud) et du dioxyde de soufre

(bleuissement d'un papier filtre imprégné d'iodate de potassium et d'empois d'amidon).

7. ESSAIS

7.1 Cendres sulfuriques

Déterminé comme il est indiqué en annexe, le taux de cendres sulfuriques de l'hydrogénosulfite d'ammonium ne doit pas être supérieur à 0,2 p. 100.

7.2 Préparation de la solution pour essais

Préparer une solution à 10 p. 100 (m/v).

7.3 Fer

A 5 ml de solution préparée pour essais (7.2), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), une goutte de permanganate de potassium à 2 p. 100 (R) et 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

Si une coloration rouge apparaît, elle devra être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 2,5 ml de solution de fer(III) à 0,01 g de fer par litre (R), 2,5 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur en fer inférieure à 50 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

7.4 Plomb

Sur la solution à 10 p. 100 préparée pour essais (7.2), diluée au vingtième, appliquer la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

7.5 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (7.2), rechercher le mercure par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/l).

7.6 Arsenic

Sur 2 ml de solution préparée pour essais (7.2), rechercher l'arsenic par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

7.7 Dosage de l'ammoniac

Diluer au dixième la solution préparée pour essais (7.2) et introduire 10 ml de cette dilution (soit 0,10 g d'hydrogénosulfite d'ammonium) dans l'appareil à entraînement à la vapeur d'eau (décrit en annexe), 10 ml d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 (R) et distiller 100 ml. Doser l'ammoniac distillé par l'acide chlorhydrique 0,1 M. Soit *n*, le nombre de millilitres versés.

100 g d'hydrogénosulfite d'ammonium contiennent 1,7 *n* g d'ammoniac (NH_3).

La teneur en ammoniac doit être supérieure à 16,5 p. 100 (m/m).

7.8 Dosage du dioxyde de soufre

Dans une fiole conique de 200 ml, placer 50 ml d'eau froide, puis 5 ml de solution d'hydrogénosulfite d'ammonium pour essais (7.2) fraîchement préparée et titrer par de l'iode 0,05 M en présence d'empois d'amidon. Soit *n* le volume d'iode utilisé.

Teneur en SO_2 pour 100 g : 6,4 . *n*

L'hydrogénosulfite d'ammonium doit contenir au moins 62 p. 100 de SO_2.

8. CONSERVATION

Les solutions d'hydrogénosulfite d'ammonium doivent être conservées dans des récipients hermétiquement clos et à l'abri de la chaleur et du froid

AMMONIUM (SULFATE D')

Ammonium sulfuricum

$(NH_4)_2SO_4$ = 132,10

N° SIN: 517

(Oeno 16/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit employé en tant qu'activateur de fermentation, réservé aux opérations fermentaires, il apporte l'ion ammonium directement assimilable par les levures. Les sulfates apportés sont totalement solubles dans le vin.

Il existe des limites réglementaires concernant l'apport d'ammonium.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de conservation.

3. COMPOSITION CENTÉSIMALE

H_2SO_4	74,22
NH_3	25,78
SO_3	60,59
N	21,20

4. CARACTERES

Cristaux anhydres, transparents, de saveur piquante et amère, semblables aux cristaux de sulfate de potassium, avec lequel ce sel est isomorphe.

5. SOLUBILITE

Eau à 20°C	509 g/l
Eau à 100°C	1040 g/l
Alcool à 90 % vol.	insoluble
Acétone	insoluble

6. CARACTERES D'IDENTITE

La solution dans l'eau à 1 p. 100 (m/v) de ce sel présente un pH voisin de 5,5. Cette solution donne les réactions de l'ammonium et celles des sulfates.

7. ESSAIS

7.1 Cendres sulfuriques

Le taux des cendres sulfuriques du sulfate d'ammonium, préparées comme il est indiqué en annexe, sur une prise d'essai de 1 g ne devra pas être supérieur à 5 g/kg.

7.2 Préparation de la solution pour essais

Préparer une solution à 10 p. 100 (m/v).

7.3 Chlorures

A 0,5 ml de la solution préparée pour essais (7.2), ajouter 14,5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Après 15 minutes de repos à l'obscurité, on ne doit pas observer de trouble, ou celui-ci doit être inférieur à celui du témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en chlorures exprimée en acide chlorhydrique, inférieure à 1 g/kg).

7.4 Phosphates

A 0,5 ml de la solution préparée pour essais (7.2), ajouter 5 ml d'eau, 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique (R). Laisser en contact 15 minutes à 20°C ; si une coloration jaune apparaît, elle doit être inférieure à celle obtenue en ajoutant à 0,5 ml d'une solution à 0,05 g de phosphore par litre, 5 ml d'eau et 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique. (Teneur en phosphates exprimée en phosphore, inférieure à 500 mg/kg).

7.5 Nitrates

Mélanger dans un tube à essais, 5 ml d'acide sulfurique (R) concentré et 0,5 ml de solution de sulfate de fer(II) à 5 p. 100 (m/v) préparée extemporanément. Verser sans mélanger 5 ml d'une solution obtenue en dissolvant 2 g de sulfate d'ammonium dans 10 ml d'eau ; on ne doit observer aucune coloration à la surface de séparation des deux solutions.

7.6 Fer

A 5 ml de la solution préparée pour essais (7.2), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), une goutte de permanganate de potassium à 2 p. 100 (R) et 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

Si une coloration rouge apparaît, elle doit être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 2,5 ml de solution de fer(III) à 0,01 g de fer par litre (R), 2,5 ml d'eau et les mêmes volumes des mêmes réactifs. (Teneur en fer inférieure à 50 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

7.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (7.2) appliquer la méthode de dosage du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

7.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (7.2), rechercher le mercure par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

7.9 Arsenic

Sur 2 ml de la solution préparée pour essais 2, rechercher l'arsenic par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

7.10 Dosage de l'ammoniac

Diluer au dixième la solution préparée pour essais (7.2) et introduire 10 ml de cette dilution (soit 0,10 g de sulfate d'ammonium) dans l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau (décrit en annexe), 20 ml d'hydroxyde de sodium à 30 % (R) et distiller 100 ml. Doser l'ammoniac distillé par l'acide chlorhydrique 0,1 M. Soit n, le nombre de millilitres versés : 100 g de sulfate d'ammonium contiennent 1,7 n g d'ammoniac (NH_3). (Teneur en ammoniac supérieure à 25 p. 100).

7.11 Dosage de l'acide sulfurique

Diluer au dixième la solution préparée pour essais (7.2), en prélever 25 ml et ajouter 75 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) ; porter à l'ébullition et ajouter lentement un léger excès de solution de chlorure de baryum (R). Laisser se former le précipité pendant 30 minutes sur un bain d'eau à 100°C. Recueillir le précipité, laver, calciner au four à 600°C et peser. Soit p le poids de précipité de sulfate de baryum :

100 g de sulfate d'ammonium contiennent 16,80 p g d'acide sulfurique (H_2SO_4). (Teneur en acide sulfurique supérieure à 73,5 p. 100).

8. CONSERVATION

Le sulfate d'ammonium doit être conservé à l'abri de l'humidité et dans des récipients hermétiquement clos, à l'abri de la chaleur.

ANTIMOUSSE
(MONO ET DIGLYCÉRIDES D'ACIDES GRAS)
N° SIN: 471
(Oeno 17/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

On appelle mono et diglycérides le mélange de mono et diesters glycériques d'acides gras - avec une petite quantité de triesters - et d'acides gras des huiles et graisses alimentaires. Le mélange de mono et diglycérides utilisé comme antimousse est essentiellement constitué d'esters de l'acide oléique.

Le produit ainsi défini peut contenir de faibles quantités d'acides gras et de glycérol libre. Son utilisation dans des conditions technologiques convenables ne laisse pas de traces mesurables dans le vin après filtration.

2. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit indiquer la composition en mono et diglycérides de la préparation, les conditions de conservation et de sécurité ainsi que la date limite d'utilisation.

3. CARACTERE

Le produit se présente sous forme soit d'un liquide huileux de couleur jaune paille, soit d'un produit pâteux de couleur ivoire, soit d'un solide cireux dur de couleur blanc ou blanc cassé, d'odeur et de goût agréables. La forme solide peut être présentée en flocons, poudre ou petits grains.

Le produit utilisé comme antimousse est généralement liquide à la température ordinaire mais il peut se troubler à basse température.

4. SOLUBILITE

Insoluble dans l'eau.

Soluble dans l'éthanol, le chloroforme et le benzène.

5. CARACTERES D'IDENTITE

5.1 Hydrolyse de l'échantillon

Traiter à reflux 1 g d'échantillon par une solution 0,5 M d'hydroxyde de potassium pendant 1 h. Ajouter 15 ml d'eau, acidifier avec de l'acide chlorhydrique dilué à 30 p. 100 (v/v) (R) (environ 4 à 5 ml). Il se forme des gouttes huileuses ou un précipité blanc à blanc jaunâtre. Extraire par 5 ml

d'hexane les acides gras libérés, séparer le solvant. Répéter l'extraction avec 5 ml d'hexane et réunir les deux extraits.

Réserver la phase aqueuse.

5.2 Caractérisation des acides gras dans l'extrait hexanique par chromatographie en phase gazeuse

A titre d'exemple, il est possible d'utiliser une colonne semi polaire de type Carbowax 20M ®. 25 m x 0,32 mm x 0,25 µm d'épaisseur de phase.

5.3 Caractérisation du glycérol

Introduire 5 ml de la phase aqueuse dans un tube à essai. Ajouter un excès d'hydroxyde de calcium en poudre et placer le tube dans l'eau bouillante pendant 5 mn. en agitant de temps en temps, refroidir et filtrer.

Mettre une goutte de filtrat dans un tube à essai et ajouter environ 50 mg d'hydrogénosulfate de potassium. Placer à l'extrémité du tube un papier filtre imbibé de réactif obtenu en mélangeant extemporanément volume à volume une solution de nitrosopentacyanoferrate de sodium (R') et de pipéridine (F'). Chauffer à l'aide d'une petite flamme. Une coloration bleue du papier réactif indique la présence d'acroléine.

La coloration vire au rouge par addition d'hydroxyde de sodium en solution 1 M.

Remarque

Il est également possible de caractériser le glycérol par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par exemple en utilisant une colonne de silice greffée par des groupement –NH2, une phase mobile eau / acétonitrile, 20 : 80, v/v, et un détecteur par refractométrie.

6. ESSAIS

6.1 Perte à la dessiccation à 100 °C

Peser exactement un poids voisin de 5 g de produit à analyser dans un cristallisoir en verre de 70 mm de diamètre, préalablement séché à l'étuve, refroidi dans un dessiccateur et taré. Introduire le cristallisoir contenant le corps gras dans l'étuve réglée à 103°C, l'y maintenir pendant 30 mn, sortir le cristallisoir, le laisser refroidir dans le dessiccateur et peser. Mettre à nouveau l'échantillon 30 mn dans l'étuve et le peser après refroidissement. La perte à l'étuve est terminée quand la diminution de poids ne dépasse pas 0,05 % par demi-heure de chauffage.

La perte à la dessiccation à 100°C doit être inférieure à 2 p. 100.

6.2 Cendres sulfuriques

Les cendres sulfuriques sont déterminées comme il est indiqué en annexe, sur une prise d'essai de 5 g, le poids doit être inférieur à 2 g/kg.

6.3 Arsenic

Déterminé comme il est indiqué en annexe, sur une prise d'essai de 5 g, l'arsenic doit être inférieur à 3 mg/kg.

6.4 Métaux lourds

Procéder à la recherche des métaux lourds :

- soit après minéralisation à 450 °C ± 5°C du résidu laissé par la détermination de la perte à la dessiccation. Reprendre les cendres par 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R) et une goutte d'acide nitrique concentré (R), en chauffant quelques instants sur un bain d'eau à 100°C pour activer la dissolution et transvaser dans une fiole jaugée de 25 ml en rinçant la capsule avec de l'eau distillée. Compléter au trait de jauge.

Prélever un volume v ml de solution correspondant à 2 g d'échantillon à analyser et procéder à la recherche des métaux lourds comme il est indiqué en annexe.

- soit après minéralisation d'une prise d'essai exactement pesée voisine de 5 g par voie liquide au moyen d'acide nitrique concentré (R) et de perhydrol en utilisant éventuellement un digesteur à micro-ondes pour accélérer l'opération.

Transvaser le liquide obtenu dans une fiole jaugée de 25 ml et porter au trait avec les eaux de rinçage. Continuer comme indiqué ci-dessus l'essai des métaux lourds.

La teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, doit être inférieure à 10 mg/kg.

6.5 Plomb

Doser le plomb selon la méthode du Recueil sur l'une des deux préparations ci-dessus (6.4). La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

6.6 Mercure

Doser le mercure selon la méthode décrite en annexe sur l'une des deux préparations ci-dessus (6.4). La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

6.7 Cadmium

Doser le cadmium selon la méthode décrite en annexe sur l'une des deux préparations ci-dessus (6.4). La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

6.8 Acides gras libres

Préparer 125 ml d'un mélange volume à volume d'alcool isopropylique et de toluène; ajouter 2 ml d'une solution de phénolphtaléine à 1 p. 100 (m/v) dans l'alcool isopropylique et neutraliser par une solution alcaline jusqu'à coloration rose faible mais persistante.

Dans une fiole conique de 500 ml, peser exactement un poids voisin de 5 g de l'échantillon à analyser; ajouter le mélange solvant neutralisé et dissoudre la prise d'essai en chauffant si nécessaire; en agitant vigoureusement, verser la solution d'hydroxyde de potassium 0,1 M jusqu'à obtention d'une coloration rose identique à celle obtenue lors de la neutralisation du solvant. Soit n ml le volume versé.

Teneur en acides gras libres exprimée en g d'acide oléique p. 100 (m/m):

$$\frac{n \cdot 2{,}8}{\text{prise d'essai en g}}$$

La teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, doit être inférieure à 3 p. 100 (m/m).

6.9 Savons

Dans une fiole conique de 250 ml, peser exactement un poids du produit à analyser voisin de 10 g. Ajouter un mélange de 60 ml d'acétone et de 0,15 ml d'une solution de bleu de bromophénol à 0,5 p. 100 (m/v) dans l'alcool à 95 % vol. préalablement neutralisé avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M ou une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M. Chauffer doucement sur bain d'eau à 70°C et titrer avec la solution d'acide chlorhydrique 0,1 M jusqu'à disparition de la coloration bleue. Laisser reposer 20 mn. Chauffer jusqu'à ce qu'un éventuel précipité soit redissous et, si la coloration bleue réapparaît, continuer la titration.

1 ml d'acide chlorhydrique en solution 0,1 M correspond à 0,0304 g d'oléate de sodium ($NaC_{18}H_{33}O_2$).

Teneur en savons, exprimée en g d'oléate de sodium p. 100 (m/m) :

$$\frac{n \cdot 3{,}04}{\text{prise d'essai en g}}$$

La teneur en savons, exprimée en g d'oléate de sodium, doit être inférieure à 6 p. 100 (m/m).

6.10 Monoglycérides

6.10.1 Préparation de l'échantillon

Faire fondre l'échantillon s'il est solide en le chauffant à une température inférieure de 10°C à son point de fusion; chauffer également un échantillon liquide qui présenterait un trouble ou des particules. Mélanger vigoureusement.

6.10.2 Mode opératoire

Peser exactement, dans un vase cylindrique de 100 ml, une prise d'essai Q de l'échantillon à doser voisine de 1 g ; la dissoudre par 25 ml de chloroforme. Transférer cette solution dans une ampoule à décantation, rincer le vase cylindrique avec 25 ml de chloroforme, puis avec 25 ml d'eau et joindre ces liquides au contenu de l'ampoule à décantation.

Boucher celle-ci hermétiquement. Agiter pendant 30 à 60 secondes. Laisser les deux phases se séparer (ajouter 1 à 2 ml d'acide acétique cristallisable (R) pour briser l'émulsion). Recueillir la phase aqueuse dans une fiole conique de 500 ml à bouchage émeri. Extraire deux fois par 25 ml d'eau la phase chloroformique restant dans l'ampoule à décanter. Séparer la phase aqueuse et la placer dans la fiole conique de 500 ml. Ces extraits aqueux seront utilisés pour le dosage du glycérol libre.

Le chloroforme est transféré de l'ampoule à décanter dans une fiole conique à bouchage émeri de 500 ml. Ajouter 50 ml de solution acétique d'acide périodique (R') en agitant.

Dans 2 autres fioles coniques de 500 ml à bouchage émeri destinées à servir de "blancs" placer 50 ml de chloroforme et 10 ml d'eau. Ajouter 50 ml de solution d'acide acétique périodique (R') en agitant dans chacune des deux fioles. Laisser reposer au moins pendant 30 mn, mais pas plus de 90 mn, les 3 fioles ainsi préparées.

A chacun de ces récipients, ajouter en agitant doucement 20 ml de solution d'iodure de potassium (R). Laisser au repos au moins 1 min. mais moins de 5 min. avant le titrage.

Ajouter alors 100 ml d'eau et titrer avec une solution 0,05 M de thiosulfate de sodium en s'aidant d'un agitateur magnétique jusqu'à disparition de la couleur brune de la phase aqueuse; ajouter alors 2 ml de solution d'empois d'amidon (R) et continuer l'addition de réactif jusqu'à disparition de l'iode de la couche chloroformique et disparition de la coloration bleue de la phase aqueuse.

6.10.3 Calculer le pourcentage en monoglycérides par la formule:

$$\frac{(B-S) \cdot M \cdot 17{,}927}{P}$$

- B est la moyenne des volumes, en ml, de solution de thiosulfate de sodium utilisés pour la détermination des blancs contenant le chloroforme.
- S est le nombre de millilitres de solution de thiosulfate de sodium utilisés pour titrer l'échantillon.
- M est la molarité de la solution de thiosulfate de sodium.
- P est le poids d'échantillon à analyser contenu dans le volume de chloroforme utilisé pour le dosage.
- 17,927 est la masse moléculaire du monostéarate de glycéryle divisé par 20.

La teneur en monoglycérides, exprimée en monostéarate de glycéryle, doit être supérieure à 30 p. 100 (m/m).

6.11 Glycérol libre

Les extraits aqueux obtenus lors du dosage des monoglycérides sont additionnés de 50 ml de solution acétique d'acide périodique (R'). Préparer simultanément un blanc en ajoutant à 75 ml d'eau placés dans une fiole conique de 500 ml, 50 ml de solution acétique d'acide périodique (R'). Continuer le dosage comme il est indiqué dans le mode opératoire décrit pour le dosage des monoglycérides.

Calculer le pourcentage de glycérol libre par la formule :

$$\frac{(b-S) \cdot M \cdot 2{,}30}{Q}$$

- b est le volume en ml de thiosulfate de sodium utilisé pour le dosage du blanc contenant 75 ml d'eau.

- S est le volume en ml de thiosulfate de sodium utilisé pour le dosage des extraits aqueux.

- M est la molarité de la solution de thiosulfate de sodium.

- Q est le poids de la prise d'essai initiale de l'échantillon à doser (voir dosage des monoglycérides).

Le glycérol libre doit être inférieur à 7 p. 100 (m/m).

Remarque

Il est également possible de caractériser le glycérol par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (5.3).

7. CONDITIONNEMENT

Les antimousses doivent être conservés dans des récipients parfaitement étanches et à l'abri de la chaleur

ARGON
Ar = 40,0
N° SIN: 938
N°CAS = 7440-37-1
(Oeno 31/2004)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Gaz neutre, utilisé pour les opérations d'inertage ou de dégazage, il est également utilisé en mélange avec de l'azote et/ou du dioxyde de carbone.

2. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit mentionner la nature du gaz et faire référence à sa composition et sa pureté, les conditions de sécurité doivent aussi être indiquées sur les emballages.

3. CARACTERES

Gaz incolore, inodore et sans saveur. Non inflammable, il n'entretient pas la combustion.

Le poids d'un litre d'argon , sous la pression de 760 mm de mercure est de 1,784 g à 0 °C. Un volume d'eau dissout 0,0336 volume d'argon à 20 °C.

4. ESSAIS

La pureté globale de l'argon doit être non inférieure à 99% en volumes.

Avant toute mesure il convient de laisser échapper le gaz pendant quelques instants pour purger les canalisations.

4.1 Dosages chromatographiques

La recherche et le dosage des gaz : Azote, oxyde de carbone (moins de 10 µl/l), oxygène (10 ml/l), hydrogène dioxyde de carbone (moins de 300 µl/l), etc., sont obtenus rapidement par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le total des surfaces des pics chromatographiques de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote ne doit pas excéder 1,0 % de celle du gaz à examiner.

On peut également utiliser pour l`oxygène la méthode chimique suivante.

4.2 Dosage de l`oxygène par méthode chimique

Préparation du flacon pour la recherche de l'oxygène :

Introduire dans un flacon de 24 ml environ deux fragments de tournure de cuivre de 2 cm^2, 16 ml de solution ammoniacale de sulfate de cuivre (R), puis 2 ml de solution de dichlorhydrate d'hydrazine (R).

Boucher le flacon avec un bouchon de caoutchouc facile à transpercer par une aiguille pour injections hypodermiques. Sertir le col avec une capsule métallique. puis enrober la capsule de cire pour assurer une étanchéité parfaite. Agiter le flacon et laisser au repos à l'abri de la lumière jusqu'à décoloration complète obtenue après environ huit jours.

Conduite de l'essai :

Transpercer le bouchon d'un flacon pour recherche de l'oxygène avec une aiguille de 8/10 de millimètre pour injection hypodermique (prendre soin de ne pas faire plonger celle-ci dans le liquide) qui servira ensuite à l'évacuation du gaz après barbotage. Introduire ensuite une deuxième aiguille de même diamètre amenant le gaz détendu et la faire plonger dans le liquide. Après une minute de barbotage, on ne doit pas observer de coloration appréciable. En présence d'oxygène, le liquide vire rapidement au bleu et la couleur s'intensifie avec le temps.

4. CONDITIONNEMENT

L'argon est livré en cylindres d'acier de forte résistance, peints en blanc, munis de robinet à pointeau. La résistance de ces cylindres doit être contrôlée périodiquement.

ASCORBIQUE (ACIDE)
2,3-didéhydro-L-thréo-hexano-4-lactone
Acidum ascorbicum
Acide L-ascorbique
$C_6H_8O_6$ = 176,1
N° SIN: 300
(Oeno 18/2000 modifiée par Oeno 4/2007)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'acide ascorbique est sous forme énolique de la 3-oxo-L-gulofuranolactone. (2,3-didéhydro-L-thréo-hexano-4-lactone)

Produit de la catégorie des antioxygènes, agent réducteur utilisé pour éviter l'oxydation.

Son emploi est soumis au limites réglementaires.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange, ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERE

Poudre cristalline blanche ou jaune très pâle, inodore. de saveur acide. Les solutions aqueuses s'altèrent rapidement à l'air et à la lumière, leur stabilité maximale est à pH 5,4. Le point de fusion en tube capillaire est voisin de 190°C avec décomposition.

L'acide ascorbique en solution aqueuse à un pH inférieur ou égal à 3.

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C	290 g/l
Alcool à 95 % vol.	320 g/l
Méthanol	125 g/l
Acétone	soluble

Ether éthylique, l'éther de pétrole : insoluble

5. POUVOIR ROTATOIRE

L'acide ascorbique en solution aqueuse à 10 p. 100 (m/v), a un pouvoir rotatoire spécifique

$[\alpha]_D^{20°C}$ est compris entre + 20,5° et + 21,5°.

6. ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET

L'acide ascorbique en solution alcoolique à 10 mg/l présente un spectre d'absorption avec un maximum voisin de 244 nm.

La solution présente une extinction spécifique :

$$E_{1\,cm}^{1pour\ cent} \text{ voisine de } 560.$$

7. CARACTERES D'IDENTITE

7.1 Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 5 g d'acide ascorbique dans de l'eau et compléter à 100 ml avec le même solvant.

7.2 Ajouter à 2 ml de la solution préparée pour essais (7.1), 0,5 g de carbonate monosodique. Il se dégage du dioxyde de carbone.

7.3 Ajouter à 1 ml de la solution préparée pour essais (7.1) quelques gouttes d'acide nitrique dilué à 10 p.100 (R) et quelques gouttes de solution de nitrate d'argent à 1 p. 100 (R). Il se forme un précipité gris.

7.4 Ajouter à 1 ml de la solution préparée pour essais (7.1) une goutte d'une solution récemment préparée de nitrohexacyanoferrate(III) de sodium $Na_2[Fe(CN)_5NO]$, $2H_2O$ (sodium pentacyano-nitrosylferrate) à 5 p. 100 (m/v) et 2 ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium à 10 p. 100 (R). Ajouter ensuite, goutte à goutte, 0,6 à 0,7 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et agiter. La coloration jaune vire au bleu.

7.5 Ajouter à 2 ml de solution de 2,6-dichlorophénolindophénol (R), la solution préparée pour essais (7.1), goutte à goutte, elle la décolore instantanément.

8. ESSAIS

8.1 Cendres sulfuriques

Déterminé sur 1,0 g d'acide ascorbique, le taux des cendres sulfuriques ne devra pas être supérieur à 1 g/kg.

8.2 Aspect de la solution

La solution préparée pour essais (7.1) est limpide et incolore.

8.3 Détermination du pH

Le pH de la solution préparée pour essais (7.1) doit être compris entre 2,4 et 2,8.

8.4 Métaux lourds

10 ml de la solution préparée pour essais (7.1) devra satisfaire à l'essai limite des métaux lourds décrite en annexe. (Teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

8.5 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (7.1), appliquer la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 2 mg/kg).

8.6 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (7.1), appliquer la méthode décrite en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

8.7 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (7.1), appliquer la méthode décrite en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

8.8 Fer

Sur la solution préparée pour essais (7.1), appliquer la méthode par spectrométrie d'absorption atomique décrite au Recueil (Teneur en fer inférieure à 5 mg/kg).

8.9 Cuivre

Sur la solution préparée pour essais (7.1), appliquer la méthode par spectrométrie d'absoprtion atomique décrite au Recueil (teneur en cuivre inférieure à 2 mg/kg).

8.10 humidité

La perte par déshydratation après séchage dans un dessiccateur sous vide à acide sulfurique pendant 24 heures, doit être inférieure à 0,4 %.

8.11 Dosage

Dissoudre dans 80 ml d'eau récemment bouillie et refroidie additionnée de 10 ml d'acide sulfurique dilué à 10 p. 100 (R), une prise d'essai exactement pesée, voisine de 0,20 g. Ajouter 1 ml d'empois d'amidon (R) et titrer par l'iode 0,05 M jusqu'à coloration bleue persistante.

1 ml d'iode 0,05 M correspond à 8,81 mg d'acide ascorbique.

Le produit doit contenir au minimum 99 p. 100 d'acide ascorbique.

9. CONSERVATION

L'acide ascorbique doit être conservé en récipient non métallique, bien fermé, à l'abri de la lumière. Les solutions aqueuses s'altèrent rapidement à l'air et à la lumière.

ACIDE ISOASCORBIQUE

L'acide isoascorbique ou acide D-ascorbique ou acide érythorbique, a le même pouvoir antioxydant que l'acide ascorbique et peut être employé dans ce même but en œnologie.

Cet acide présente le même aspect et les mêmes caractères de solubilité que l'acide ascorbique.

Inverse optique de l'acide ascorbique, il a, dans les mêmes conditions, un pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D^{20°C}$ compris entre –20° et -21,5°.

Cet acide doit présenter les mêmes caractères, à part le pouvoir rotatoire, que l'acide ascorbique, répondre aux mêmes réactions d'identification, satisfaire aux mêmes essais et répondre au même dosage.

Remarque : L'activité vitaminique C de l'acide isoascorbique est environ 1/20 de celle de l'acide ascorbique.

Note: Il existe un avant projet de résolution pour l'inscription de ce produit au Code international des pratiques œnologiques.

BACTERIES LACTIQUES
(OIV-Oeno 328-2009, OIV-Oeno 494-2012)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les bactéries lactiques sont utilisées en œnologie pour effectuer la fermentation malolactique. Elles doivent appartenir aux genres Oenococcus (*Leuconostoc), Lactobacillus et Pediococcus* et doivent avoir été isolées des raisins, des moûts ou des vins ou être dérivées de ces bactéries.

L'utilisation de bactéries génétiquement modifiées doit être soumise à l'autorisation préalable des autorités compétentes.
Les souches de bactéries lactiques doivent être conservées dans les conditions favorisant leur stabilité génétique.
Une bactérie lactique utilisable en œnologie doit donc transformer l'acide malique du moût ou du vin en acide lactique et en dioxyde de carbone, ne devrait produire des amines biogènes qu'en quantités les plus faibles possibles, et ne doit pas donner de faux goûts.

2. ETIQUETAGE

Doivent figurer sur l'étiquette:

- Le nom du genre, la ou les espèces ainsi que la ou les références de souches dans le cas où il existe un organisme d'enregistrement
- L'entité de l'obtenteur ou du sélectionneur
- Le mode d'emploi ou la méthode et les éventuels additifs de réactivation préconisés par le fabricant.
- Le nombre minimum de cellules revivifiables par gramme de préparation qui est garanti par le fabricant.
- Le numéro de lot de fabrication, en plus de la date d'expiration et des conditions de stockage avec une indication par le fabricant d'une température de stockage conseillée.
- Le cas échéant, l'indication que les bactéries lactiques ont été obtenues par modifications génétiques ainsi que le ou les caractères modifiés.
- Les additifs.

3. CARACTERES

Elles sont commercialisées, soit sous forme liquide, soit sous forme congelée, soit déshydratée par lyophilisation ou séchage, en culture pure ou en association de cultures pures.

4. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

4.1 - Humidité pour les bactéries lyophilisées ou sèches

Mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant (environ 3 heures).
La teneur maximale doit être inférieure à 8 %.

4.2 - Plomb
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.3 - Mercure
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.4 - Arsenic
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.5 - Cadmium
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.6 - Bactéries lactiques revivifiables
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Le nombre doit être supérieur ou égal à 10^8 UFC/g ou 10^8 UFC/ml pour les bactéries lactiques sous forme liquide ou congelée.
Le nombre doit être supérieur ou égal à 10^{11} UFC/g pour les bactéries lactiques sous forme lyophilisée ou sèche.

Note : sauf pour les bactéries spécifiques destinés aux vins acides (pH jusqu'à 2,85) qui doivent être utilisées avec un procédé de pré-multiplication dans du moût et/ou du vin figurant en annexe, dont la population ne pourra être inférieure à 10^9 UFC/g .

1) Référence : Bridier, J., O. Claisse, M. Coton, E. Coton and A. Lonvaud-Funel (2010). "Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*." Appl Environ Microbiol 76(23): 7754-7764.

4.7 - Moisissures
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Le nombre doit être inférieur à 10^3UFC/g.

4.8 - Bactéries acétiques contaminantes
Procéder au dénombrement selon les méthodes figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Le nombre de bactéries acétiques doit être inférieur à 10^3 UFC/ml pour les bactéries acétiques sous forme liquide ou congelée ou 10^4 UFC/g pour les bactéries acétiques sous forme lyophilisée ou sèche. La somme *Acetobacter* + *Gluconobacter* doit être inférieure à 10^3

UFC/ml pour les bactéries acétiques sous forme liquide ou congelée ou 10^4 UFC/g pour les bactéries acétiques sous forme lyophilisée ou sèche.

4.9 – Levures contaminantes
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Le nombre de cellules revivifiables de levures contaminantes total doit être inférieur à 10^3 UFC/g pour les bactéries sous forme lyophilisée ou sèche ou 10^2 UFC/ml pour les bactéries sous forme liquide ou congelée.

4.10 - Salmonelles
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.11 - *Pseudomonas aeruginosa*[2]

4.12 - *Escherichia coli*
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour *Escherichia coli* TEM figurant en annexe.
Une suspension mère de bactéries lactiques est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de bactéries lactiques pour 10 ml de solution (volume total). 2 mL de la solution mère sont transférés dans chaque plaque en utilisant 5 plaques différentes.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.13 - Staphylocoques
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international. La présence de staphylocoques est évaluée par une culture d'enrichissement sur milieu liquide Giolitti et Cantoni suivi d'une confirmation sur milieu solide Baird Parker figurant en annexe.

Une suspension mère de bactéries lactiques est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de bactéries lactiques pour 10 ml de solution (volume total). 10 ml de suspension mère sont utilisés pour inoculer un milieu Giolitti et Cantoni au Tween 80 double concentration. Les cultures sont incubées 48 h à 37 °C.
Dans le cas où des tubes de milieu Giolitti et Cantoni donnent une réponse positive, la présence de Staphylocoques est confirmée par isolement sur milieu solide Baird Parker. Une anse des milieux de culture positif sont utilisée pour inoculer des milieux solides BP de sorte à obtenir des colonies isolées. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.14 - Coliformes

[2] Point à étudié ultérieurement par le groupe d'expert "Microbiologie"

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour coliformes gélose au désoxycholate figurant en annexe.
Une suspension mère de bactéries lactiques est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de bactéries lactiques pour 10 ml de solution (volume total). 2 mL de la solution mère sont transférés dans chaque plaque en utilisant 5 plaques différentes.
Le nombre doit être inférieur à 10^2 UFC/g.

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant.

Annexe

Préparation d'un « pied de cuve malo »

pour ensemencer 100 hL de vin ou un volume quelconque
à partir des valeurs entre parenthèses en %,
les quantités de poudre sont exprimées en g/L

Réactivation

Moût pH > 3,2 - peu sulfité (SO_2 < 40 mg/L)
10 litres (3 % du pied de cuve)

Eau chaude pour obtenir un mélange à 25°C :
10 litres (3 % du pied de cuve)

Activateur : 100 ou 200 g, soit 5 ou 10 g/L *

Bactéries : 80 g, soit 4 g/L

LSA : 10 g, soit 0,5 g/L

20 litres
Température
25°C

* Selon l'activateur utilisé

Après 3 jours

Pied de cuve

Moût peu sulfité (SO_2 < 40 mg/L)
3 hL (3 % du volume à ensemencer)

LSA : 60 g, soit 0,2 g/L

3 hL
Température
25°C pendant FA
20°C pendant FML

Quand l'acide malique
est dégradé au 2/3

Cuve

100 hL de **vin**
en cours ou en fin de FA

100 hL

BENTONITES
Bentonita
N° SIN : 558
(Oeno 11/2003, Oeno 441-2011)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les bentonites sont des silicates d'alumine hydratés appartenant au groupe des montmorillonites de formule brute :

$Si_4 (Al_{(2-x)} R_X)(O_{10}, H_2O)(Ce_X, nH_2O)$ ou $Si_4(Al_{(2-x)}R_X)(H_2O)n$ avec :

- R = Mg, Fe, Mn, Zn, Ni
- Ce (cations échangeables) = Ca, Na, Mg.

Elles sont utilisées pour des opérations de clarification ou de stabilisation protéique des moûts et des vins. Les bentonites fixent certaines protéines instables et permettent ainsi leur élimination. Les bentonites sont capables de fixer de la matière colorante.

2. ETIQUETAGE

L'étiquetage indiquera la nature de la bentonite (sodique naturelle, calcique, calcique activée) le numéro de lot et la date limite d'utilisation optimale (DLUO) en ce qui concerne les bentonites activées. Il devra faire apparaître les mentions de risque et de sécurité relatives à la présence de silice cristalline.

2.1 Bentonites naturelles:

En fonction de la nature du cation échangeable présent, il existe à l'état naturel deux types de bentonites :

- les **bentonites sodiques**, où le sodium est le cation échangeable majoritaire, elles ont un fort pouvoir de gonflement et d'adsorption.

- les **bentonites calciques,** où le calcium est le cation échangeable majoritaire, elles ont un pouvoir de gonflement et d'adsorption plus faible que les bentonites sodiques.

Ces deux types de bentonites, éventuellement après un séchage à 80-90 °C, sont simplement broyées avant leur commercialisation.

2.2 Bentonites activées :

Afin d'améliorer les propriétés d'adsorption des bentonites calciques, ces dernières sont le plus souvent activées par du carbonate de sodium puis séchées et broyées; on obtient ainsi des bentonites calciques activées dont les propriétés sont égales ou supérieures à celles des bentonites sodiques.

Les propriétés de ces bentonites ainsi activées ou permutées sont moins stables dans le temps (3 à 18 mois) et dépendent de l'activation et des taux de magnésium, calcium et sodium.

Ces différents types de bentonites se présentent sous forme de poudre ou de granulés sphériques ou cylindriques. Elles ont des couleurs très variables allant du blanc pour les produits les plus purs au gris, beige ou vert pour les autres.

3. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

3.1 Odeur

La bentonite ne doit pas présenter d'odeur indésirable (p.e. moisi) et ne pas céder de goût au vin.

3.2 Mesure du pH [1]

Agiter 5 g de bentonite avec 100 ml d'eau distillée pendant 5 minutes. Après une heure de repos, mesurer le pH du liquide surnageant. Les bentonites calciques naturelles ont un pH voisin de la neutralité (entre 6,5 et 8,5 alors que les bentonites calciques activées ont un pH plus alcalin (entre 8,5 et 10,0). Les bentonites sodiques naturelles ont une gamme de pH plus large (entre 4,7 et 10,0).

3.3 Perte à la dessiccation

Par dessiccation de 5 g de bentonite à 105 °C pendant 4 heures, la perte de poids doit être comprise entre 5 et 15 p. 100 du poids initial (le plus souvent voisin de 10 p. 100).

3.4 Préparation de la solution pour essais

Peser **p** g de bentonite contenant 10 g de bentonite anhydre.

Dans un flacon de 500 ml à large col, pouvant être hermétiquement bouché, placer 100 ml de la solution d'acide tartrique à 5 g par litre amené à pH 3 (R). Faire tomber en pluie la prise d'essai de bentonite dans la solution constamment agitée (par exemple à l'aide d'un agitateur magnétique) en s'aidant d'un entonnoir. Une fois terminée cette addition, agiter énergiquement pendant 5 minutes. Laisser reposer 24 ou 48 heures.

Décanter, centrifuger ou filtrer si nécessaire pour obtenir au moins 100 ml de liquide clair.

Toutes les limites suivantes fixées pour la bentonite sont rapportées au poids de bentonite sèche.

3.5 Teneur en montmorillonite

Taux minimum :

Ne doit pas être inférieur à 80 %, résultat donné par le fabricant (méthode de diffraction aux rayons X).

3.6 Teneur en différentes formes de silice libre

La teneur en silice cristalline (quartz N° CAS 14808-60-7, cristobalite N° CAS 14464-46-1) doit être inférieure à 3 p.100.

Le taux de particules inférieures à 10 microns doit être inférieur à 10%.

La teneur en silice cristalline respirable doit être inférieure à 0,3%.

Ces normes doivent figurer sur la fiche de sécurité fournie par le fabricant.

3.7 Plomb

Sur la solution préparée pour les essais selon (3.4), faire le dosage à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II.

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

3.8 Mercure

Sur la solution préparée pour les essais (3.4) déterminer la teneur en mercure selon la méthode décrite au Chapitre II.

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

3.9 Arsenic

Sur 5 ml de solution préparée pour les essais (3.4), rechercher l'arsenic par la méthode décrite au Chapitre II

La teneur en arsenic soluble doit être inférieure à 2 mg/kg.

3.10 Fer

A 5 ml de solution préparée pour les essais (3.4), ajouter 12,5 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge doit être inférieure à celle que l'on obtient en utilisant 2,5 ml d'acide citrique à 5 p. 100 à pH 3 (R) 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), 15 ml de solution d'un sel de fer(III) à 0,010 g de fer par litre (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

La teneur en fer doit être inférieure à 600 mg/kg.

Le fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II.

3.11 Aluminium

Sur la solution préparée pour les essais (3.4), rechercher l'aluminium extractible selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en aluminium extractible doit être inférieure à 2,5 g/kg.

3.12 Calcium et magnésium

Sur la solution préparée pour les essais (3.4), doser le calcium et le magnésium par les méthodes figurant dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

La somme calcium + magnésium soluble doit être inférieure à 100 meq pour 100 g.

3.13 Sodium

Sur la solution préparée pour les essais (3.4), doser le sodium par la méthode figurant dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

La teneur en sodium soluble doit être inférieure à 10 g/kg pour les bentonites naturelles et inférieure ou égale à 35 g/kg pour les bentonites activées.

3.14 Présence de grosses particules

Placer 1 l d'eau dans un verre à pied de 1,5 l. Ajouter lentement et en agitant sans cesse le liquide, une quantité de bentonite correspondant à 50 g de bentonite sèche. Agiter énergiquement 2 à 3 minutes et laisser au repos 24 heures. Agiter 2 à 3 minutes, laisser reposer 2 minutes. Rejeter par un siphon les 9/10 du liquide trouble qui surmonte les 100 ml de liquide et le dépôt est à laisser au fond du verre. Ajouter 900 ml d'eau, agiter 1 minute. Laisser reposer 2 minutes et recommencer ainsi jusqu'à avoir fait 5 lavages. Recueillir le dépôt dans une capsule. Sécher et peser. Le résidu doit être inférieur à 8 g pour 100 g.

3.15 Essai de désacidification

Peser un poids **p** de bentonite contenant 0,2 g de bentonite sèche. L'introduire dans un flacon de 125 ml contenant 50 ml de solution 0,033 M d'acide citrique (R). Agiter énergiquement pendant 5 minutes et laisser au repos pendant 30 minutes. Filtrer ou centrifuger. Prélever 10 ml de filtrat et titrer l'acidité par la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium en présence d'une

goutte de solution de phénolphtaléine (R). Soit ***n*** ml le volume versé pour obtenir le virage de l'indicateur :

250 (10 - **n**) est le nombre de milliéquivalents d'acides fixés ou neutralisés par 100 g de bentonite.

La limite maximale est de 2,5 eq /kg.

3.16 Taux de gonflement

Indice de gonflement : test spécifique nécessaire

2 g de bentonite est saupoudré sur 100 ml d'eau déminéralisée et sur 100 ml de vin placés dans une éprouvette graduée. Après 24 heures, on mesure le volume occupé par la bentonite. Celui-ci sera exprimé en ml/g de produit sec.

3.17 Essai d'adsorption de protéines (pour les bentonites destinées à la déprotéinisation) :

3.17.1 - Préparation de la solution d'essai :

mélanger 5 g de blanc d'oeuf avec une quantité suffisante de solution d'acide citrique à 5 g par litre (pH= 3) pour avoir 1 litre. Filtrer. Doser l'azote total sur 100 ml de cette solution par la méthode décrite au Chapitre II. Cette solution contient environ 90 mg d'azote total soit 575 mg de protéines par litre.

3.17.2 - A 100 ml de cette solution ; pour chaque essai, apporter des doses croissantes de bentonites préparées en suspension à 5 %, de manière à traiter aux doses de 0,1 à 0,8 g/l. Agiter vigoureusement et maintenir à 15-20 °C pendant 6 heures. Centrifuger et procéder au dosage de l'azote total ou des protéines résiduelles.

Une bentonite de qualité déprotéinisante doit éliminer au moins 50 % des protéines de la solution synthétique à la dose de 0,4 g/l .

3.18 Détermination de la surface spécifique d'adsorption (ou indice d'adsorption du bleu de méthylène)

Méthode décrite en annexe

La limite d'acceptation doit être de 300 mg/100g

4. CONSERVATION

Les bentonites doivent être conservées dans des lieux ventilés dans des récipients étanches à l'abri d'éléments volatils qu'elles peuvent adsorber.

ANNEXE

DETERMINATION DE LA SURFACE SPECIFIQUE D'ADSORPTION DE LA BENTONITE

1. GÉNÉRALITÉS

1.1 But de l´essai

Cet essai permet de mesurer la capacité de la bentonite à adsorber du bleu de méthylène.

Le bleu de méthylène étant adsorbé préférentiellement par les argiles, les matières organiques et les hydroxydes de fer, cette capacité rend compte globalement de l´activité de surface de ces éléments.

On appelle «valeur de bleu» de la bentonite, la quantité exprimée en grammes de bleu de méthylène adsorbée par 100 g de bentonite.

1.2 Principe de l´essai

On injecte successivement des doses élémentaires d´une solution de bleu de méthylène dans le bain aqueux contenant la prise d´essai. On contrôle l´adsorption du bleu après chaque ajout, en effectuant une tache sur un papier filtre (test de la tache, voir paragraphe 5).

Pour un simple contrôle de conformité, la quantité de bleu spécifiée est injectée en une seule fois.

2. APPAREILLAGE ET REACTIF

2.1 Une burette de capacité 25 ml et de graduation 1/10 ml

2.2 Papier filtre : quantitatif et sans cendres (< 0,010) ; grammage : 95 g/m^2 ; épaisseur : 0,20 mm ; vitesse de filtration 75 ; rétention : 8 micromètres.

2.3 Une baguette de verre : longueur 300 mm ; diamètre 8 mm.

2.4 Un agitateur magnétique et barreau aimanté.

2.5 Solution de bleu de méthylène de qualité médicinale à 10 g/l ± 0,1 g/l La durée maximale d´utilisation de la solution est de un mois. Elle doit être conservée à l'abri de la lumière.

2.6 Eau déminéralisée ou distillée.

3. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Ajouter 10 g de bentonite dans 200 ml d'eau distillée, laisser gonfler pendant 2 heures, puis homogénéiser par agitation.

4. EXECUTION DE L'ESSAI

4.1 Définition du test à la tache

Après chaque addition de bleu (voir paragraphe 5.2), ce test consiste à prélever, à l'aide de la baguette de verre, une goutte de suspension que l'on dépose sur le papier filtre. La tache ainsi formée se compose d'un dépôt central de matériau, coloré d'un bleu généralement soutenu, entouré d'une zone humide incolore.

La goutte prélevée doit être telle que le diamètre du dépôt soit compris entre 8 et 12 mm.

Le test est dit positif si, dans la zone humide, apparaît autour du dépôt central une auréole bleu clair persistante. Il est dit négatif si l'auréole est incolore.

4.2 Dosage

A l'aide de la burette, verser 2 ml de solution de bleu dans le récipient contenant les 200 ml de suspension de bentonite maintenue en agitation. Après 2 mn, ajouter une dose de 1 ml de solution de bleu, cette addition étant suivie du test de la tache sur le papier filtre. On laisse s'opérer l'adsorption du bleu, qui n'est pas instantanée, tout en effectuant des tests de minute en minute.

Si l'auréole bleu clair disparaît à la cinquième tache on procède à de nouvelles additions élémentaires de bleu de 0,2 ml, puis de 0,1 ml.

Chaque addition est suivie de tests effectués toujours de minute en minute.

Renouveler ces opérations jusqu'à ce que le test demeure positif pendant cinq minutes consécutives : le dosage est alors considéré comme terminé.

Soit V ml versés

5. EXPRESSION DES RESULTATS

5.1 Valeur de bleu

La valeur de bleu exprimée en grammes de bleu pour 100 g de bentonite est donnée par la formule :

$$V \times 10$$

V étant le volume de bleu de méthylène versé en ml.

5.2 Contrôle de conformité par rapport à une spécification donnée

La spécification est exprimée en valeur de bleu pour 100 g de bentonite, soit *s* cette valeur.

Le volume de la solution de bleu à ajouter en une seule fois à la préparation (4) est alors :

$$V = \frac{s}{10}$$

Le test de la tache est effectué après huit minutes d'agitation. s'il est négatif, la bentonite est conforme à la spécification.

[1] Modifié par Oeno 441-2011

BÊTA-GLUCANASES de *Trichoderma Sp* (Oeno 27/2004)

(E.C. 3-2-1-58)
(C.A.S. No. 9073-49-8)

Glucane 1,3-bêta-glucosidase
(exo-1,3-bêta-glucosidase ; bêta-1,3-glucan exo-hydrolase ;
exo-1,3-bêta-glucanase; endo-1,3-bêta-glucanase)
et glucane 1,6-bêta-glucosidase

SPECIFICATIONS GENERALES

Les spécifications doivent être conformes aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques qui figurent dans le Codex œnologique international.

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Dégradation de bêta-glucanes présents dans les vins, notamment ceux provenant de raisins atteints par *Botrytis cinerea* ou les glucanes levuriens. Ces molécules de très haut poids moléculaire hydrolysent les liaisons bêta-1,3 et bêta-1,6 de 1,3-(1,6)-bêta-D-glucanes avec production de glucose.

Activités secondaires : hémicellulases, cellulases

Les béta-1,3-D-glucanases sont produites à partir de *Trichoderma harzianum* et/ou *Trichoderma reesei*

La préparation de l'enzyme est sans conséquence nuisible, La production et la purification le sont également.
Les bêta-glucanases ne doivent contenir ni substances, ni micro-organismes ni activités enzymatiques collatérales qui peuvent :
- être nuisibles à la santé,
- être nuisibles à la qualité des produits traités,
- conduire à la formation de produits indésirables, ou favoriser des interventions de fraudes.

Il existe des limites réglementaires à l'utilisation des bêta-glucanases dans le vin.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, ainsi que les conditions de sécurité, de conservation et la date limite d'utilisation.

3. CARACTERES

En général il s'agit de poudres amorphes grisâtres à marron-clair ou de granules ou de liquides marron-clair à brun-foncé.

4. SOLUBILITE

Soluble dans l'eau et pratiquement insoluble dans l'éthanol et l'éther

5. ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'activité est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer dans des conditions standardisées (voir mesure de l'activité selon une méthode à décrire), une quantité de sucres réducteurs correspondant à 1 µmole de glucose par minute.

Remarque : l'enzyme produite selon le paragraphe 6 possède simultanément des activités bêta-1,3-glucanase et bêta-1,6-glucanase ce qui lui confère les propriétés œnologiques recherchées.

6. SOURCE DE L'ENZYME ET MOYEN DE PRODUCTION

Les béta (-1,3-1,6) glucanases sont produites par fermentation immergée d'une souche sélectionnée non pathogène, non toxinogène de *Trichoderma harzianum et/ou Reesei*, non modifiée génétiquement, en culture pure.

7. SUPPORTS DILUANTS, AGENTS DE CONSERVATION ET ADDITIFS.

La préparation de béta-glucanase se présente généralement sous forme de granulés. Ces produits sont préparés avec les diluants alimentaires ou des additifs alimentaires tels que la maltodextrine le citrate de sodium et de l'acide citrique, l'amidon ou le glucose.

8. ESSAIS

8.1 Perte à la dessiccation : Inférieure à 10 %. (ne s'applique pas aux préparations liquides)

8.2 Cendres sulfuriques
Déterminer les Cendres sulfuriques selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique international.
Le taux de cendres sulfuriques des bêta-glucanases ne doit pas être supérieur à 2 p. 100 de matières sèches.

8.3 Préparation de la solution pour essais
Dissoudre 5 g de bêta-glucanases dans 100 ml d'eau.

8.4 Métaux lourds
A 10 ml de solution préparée pour essais (8.3), ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R), 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Aucun précipité ne doit se produire. Si une coloration brune apparaît, elle doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué au Chapitre II du Codex Œnologique international.
La teneur en métaux lourds exprimée en plomb, doit être inférieure à 30 mg/kg.

8.5 Arsenic
Sur 2 ml de solution préparée pour essais (8.3), rechercher l'arsenic par la méthode indiquée au Chapitre II du Codex Œnologique international.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

8.6 Plomb
A partir de la solution préparée pour essais (8.3) doser le plomb selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international
La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

8.7 Mercure
A partir de la solution préparée pour essais (8.3) doser le mercure selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.
La teneur en mercure doit être inférieure à 0,5 mg/kg.

8.8 Cadmium
A partir de la solution préparée pour essais (8.3) doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 0,5 mg/kg.

8.9 Contaminants biologiques

Déterminations effectuées selon les méthodes décrites au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Germes totaux	moins de 5. 10^4 UFC/g de préparation
Bactéries totales	inférieur à 10^3 UFC/g de préparation
Coliformes totaux	moins de 30 UFC/g de préparation
Escherichia coli	absence vérifiée sur un échantillon de 25 g
*St. aureus**	absence vérifiée sur un échantillon de 1 g
Salmonelles	absence vérifiée sur un échantillon de 25 g
Anaérobies sulfitoréducteurs	moins de 30 UFC/g de préparation

Levures	teneur limite : 10^2 UFC/g de préparation.
Bactéries lactiques totales	absence contrôlée sur un échantillon de 10 g.
Bactéries acétiques	teneur limite : 10^2 UFC/g de préparation
Moisissures	teneur limite : 10^2 UFC/g de préparation.
Activité antibiotique*	non détectable
Mycotoxines*	non détectables

9. CONSERVATION

Sous forme solide, la préparation se conserve plusieurs années et, sous forme liquide, quelques mois à basse température (+ 5 °C).

* Méthodes à définir par la Sous-commission des méthodes d'analyse

CALCIUM (CARBONATE DE)

Calcii carbonas

$Ca\ CO_3$ = 100,1

N° SIN:170

(Oeno 20/2000 modifiée par Oeno 4/2007)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit utilisé pour la désacidification. L'apport d'ions calcium provoque la salification de l'acide tartrique libre. Le carbonate de calcium est aussi autorisé dans la technique de désacidification par la méthode dite de "double-sel" ; il peut alors contenir de petites quantités de tartro-malate de calcium (double-sel) et/ou de tartrate de calcium. Il existe une réglementation concernant l'utilisation du produit.

2. ETIQUETAGE

La teneur en carbonate de calcium pur devra être indiquée ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

Dioxyde de carbone	43,97
Calcium	40,04

4. CARACTERES

Le carbonate de calcium se présente sous forme d'une poudre blanche qui donne les réactions des carbonates. Sa solution à 5 p. 100 (m/v) dans l'acide acétique dilué (R) donne les réactions du calcium.

5. SOLUBILITE

insoluble dans l'eau

insoluble dans l'alcool à 95 % vol.

soluble avec effervescence dans les solutions diluées des acides acétique, chlorhydrique et nitrique.

6. ESSAIS

6.1 Perte à la dessiccation

Peser 2 g de carbonate de calcium dans une capsule. Placer dans une étuve à 200°C pendant 4 heures. La perte de poids ne doit pas être supérieure à 2 p. 100

6.2 Matières solubles dans l'eau

Broyer 2 g de carbonate de calcium avec 20 ml d'eau bouillie ; filtrer ; Recueillir 10 ml. la solution doit être neutre. Evaporer à sec ; le résidu ne doit pas être supérieur à 1 p. 100.

6.3 Ions ammoniacaux

Dans le ballon d'un appareil à distiller, placer 2 g de carbonate de calcium, 25 ml d'eau distillée et 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 (R).

Distiller et Recueillir 20 ml de distillat dans 40 ml d'acide borique à 4 p. 100 (R) en présence de rouge de méthyle (R). Deux gouttes de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique doivent suffire pour faire virer l'indicateur.

6.4 Baryum

Dissoudre 0,50 g de carbonate de calcium dans 10 ml d'acide nitrique dilué à 10 p.100 (R). Ajouter 10 ml de solution saturée de sulfate de calcium (R). Le mélange doit rester limpide.

6.5 Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 10 g de carbonate de calcium dans 100 ml d'acide acétique dilué à 10 p. 100 (m/v) (opérer avec précaution à cause de l'effervescence due au dégagement de dioxyde de carbone).

6.6 Magnésium

Sur la solution préparée pour essais 6.5, utiliser la méthode figurant au Recueil. (Teneur inférieure à 1 p. 100 en poids).

6.7 Fer

Sur la solution préparée pour essais (6.5) utiliser la méthode par spectrométrie d'absorption atomique figurant au Recueil. (Teneur en fer inférieure à 300 mg/kg).

6.8 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (6.5), doser le plomb à l'aide de la méthode décrite en annexe. (Teneur en plomb inférieure à 2 mg/kg).

6.9 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (6.5), doser le mercure à l'aide la méthode décrite en annexe.(Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg.)

6.10 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (6.5) faire la recherche de l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

6.11 Sodium

Sur la solution préparée pour essais (6.5), doser le sodium par photométrie de flamme selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en sodium inférieure à 500 mg/kg).

6.12 Dosage

Dissoudre une prise d'essai **p**, exactement pesée, voisine de 2 g dans 50 ml de solution 1 M d'acide chlorhydrique. Porter à l'ébullition. Laisser refroidir et titrer l'acide chlorhydrique en excès à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium 1 M en présence de rouge de méthyle (R).
Soit **n** le nombre de millilitres de solution d'hydroxyde de sodium 1 M employés :

1 ml de solution molaire d'acide chlorhydrique correspond à 0,05005 g de carbonate de calcium.

Teneur p. 100 en carbonate de calcium du produit essayé

$$\frac{(50-n)\ 5{,}005}{\mathbf{p}}$$

Le produit oenologique doit contenir au minimum 98 p. 100 de carbonate de calcium.

7. CONSERVATION

Le carbonate de calcium doit être conservé à l'abri de l'humidité, dans des récipients hermétiquement clos à l'abri d'éléments volatils qu'il peut adsorber.

CALCIUM (PHYTATE DE)
Inosito-hexaphosphate de calcium
Calcii phytas
$C_6H_6Ca_6O_{24}P_6$, $3H_2O$ = 942,11
(Oeno 21/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le phytate de calcium est le sel de l'ester hexaphosphorique d'inositol ou acide inositohexaphosphorique ou acide phytique.

Sous forme de sel double de calcium et de magnésium, l'acide phytique constitue la phytine, forme de réserve de phosphore dans les plantes.

Agent complexant du fer(III) autorisé pour éliminer un excès de fer dans les vins, son emploi doit être suivi d'un contrôle rigoureux.

Tout excès de phytate par rapport à la teneur en fer(III) provoque des dépôts dès la moindre oxydation.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

Poudre blanche de saveur acidulée, peu soluble dans l'eau, difficilement et incomplètement soluble dans le vin, soluble dans les acides forts dilués.

La solution aqueuse de phytate de calcium présente un caractère acide révélé par le virage de l'indicateur au tournesol, elle donne les réactions du calcium.

4. ESSAIS

4.1 Perte à la dessiccation

Dessécher à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant une prise d'essai voisine de 1 g de phytate de calcium. La perte de poids doit être inférieure à 12 p. 100.

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

4.2 Cendres

Incinérer à 550°C environ une prise d'essai voisine de 0,250 g de phytate de calcium ; le résidu ne doit pas être inférieur à 65 p. 100, ni supérieur à 72 p. 100 du produit sec contenu dans la prise d'essai.

4.3 Substances insolubles

Préparer une première solution contenant 1 g de phytate de calcium, 7 ml de solution d'acide chlorhydrique 1M et 93 ml d'eau distillée. D'autre part, préparer une solution contenant 1 g de phytate de calcium avec 50 ml d'eau distillée et 1,5 ml d'acide phosphorique pur (R). Filtrer séparément chacune des solutions ainsi obtenues et Recueillir le dépôt, le laver et le sécher à 100°C. Chaque résidu doit être inférieur à 1 partie pour 100 parties (10g/kg) de produit séché à 105°C.

4.4 Amidon

Ajouter aux résidus obtenus à l'essai précédent 4.3 quelques gouttes d'eau iodée (R) ; il ne doit pas se développer de coloration bleue.

4.5 Sucres

Agiter 3 g de phytate de calcium avec 15 ml d'eau distillée. Filtrer. Le filtrat ne doit pas réduire le réactif cupro-alcalin (R) soit avant, soit après inversion du saccharose.

4.6 Albumine

Dissoudre 1 g de produit dans un mélange de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et de 3 ml d'eau distillée. Ajouter 3 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 30 % (R). Filtrer. Le filtrat additionné d'une goutte de solution de sulfate de cuivre(II) à 4 p. 100 (m/v) ne doit pas donner de coloration violette.

4.7 Préparation de la solution pour essais

Faire macérer une quantité de phytate de calcium contenant 5 g de produit sec avec 100 ml d'acide citrique à 10 g par litre (R) pendant 24 heures en agitant de temps en temps. Filtrer.

4.8 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (4.7), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration obtenue doit être inférieure à celle présentée par un tube témoin préparé avec 2,5 ml de solution à 0,010 g de fer par litre (R), 7,5 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de thiocyanate à 5 p. 100 (R). (Teneur en fer inférieure à 50 mg/kg).

4.9 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (4.7), doser le plomb à l'aide de la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

4.10 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (4.7) doser le mercure à l'aide de la méthode décrite en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

4.11 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (4.7), doser l'arsenic à l'aide de la méthode décrite en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

4.12 Phosphates minéraux

Dans une fiole jaugée de 200 ml, introduire 0,50 g de phytate de calcium, ajouter 100 ml d'eau distillée, 5 ml d'acide nitrique concentré (R). Agiter 15 minutes à 20°C et porter le volume à 200 ml avec de l'eau distillée. A l0 ml de cette solution, ajouter 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique (R). Laisser en contact 15 minutes à 20°C ; la coloration ne doit pas être plus intense que celle obtenue en ajoutant à 5 ml d'une solution de phosphate monopotassique contenant 0,05 g de phosphore par litre (R), 5 ml d'eau distillée et 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique (R). (Teneur en phosphates minéraux, exprimée en phosphore, inférieure à 1 p. l00).

4.13 Glycérophosphates

Chauffer 0,50 g de phytate de calcium en présence de sulfate monopotassique ; il ne doit pas se dégager de vapeurs d'acroléine (odeur de corne brûlée).

4.14 Dosage du phosphore total

Peser exactement une prise d'essai de 0,25 g de phytate de calcium préalablement desséché à 105°C. L'introduire dans un ballon sur lequel peut s'adapter grâce à un rodage un tube de 8 mm de diamètre et 1 m de long, devant servir de réfrigérant à reflux ; ajouter 5 ml d'acide sulfurique concentré (R) et 0,5 ml d'acide nitrique concentré (R). Porter à ébullition sous reflux pendant un quart d'heure environ. Après refroidissement, transvaser le contenu du ballon dilué avec de l'eau, dans une fiole jaugée d'un litre. Rincer réfrigérant et ballon avec de l'eau en versant ces liquides dans la fiole jaugée et porter au trait de jauge après avoir ramené à 20°C. Agiter.

A 10 ml de cette solution, ajouter 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique (R), agiter dans un bain d'eau à 20°C et laisser reposer durant 15 minutes dans le bain d'eau. La coloration obtenue doit être égale

ou supérieure à celle d'un essai de référence préparé dans les mêmes conditions avec 8 ml de solution de phosphate monopotassique à 0,05 g de phosphore par litre (R), 2 ml d'eau et 10 ml de réactif nitro-vanadomolybdique (R).

Le dosage du phosphore total peut être réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 425 nm, la courbe d'étalonnage étant obtenue à partir de 4-6-8-10 ml de la solution de phosphate monopotassique à 0,05 g de phosphore par litre (R).

Le phytate de calcium doit contenir au minimum 15 p. 100 de phosphore total, rapporté au produit desséché à 105°C.

5. CONSERVATION

Le phytate de calcium doit être conservé à l'abri de l'humidité et dans des récipients hermétiquement clos.

CALCIUM (TARTRATE)

Tartrate de calcium droit

Calcium tartaricum

L(+)-2,3-dihydroxybutanedioate de calcium, tétrahydrate

(OOC-CHOH-CHOH-COO) Ca, $4H_2O$)

$C_4H_{12}O_{10}$ Ca = 260,13

N° SIN: 354

(Oeno 22/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Sel naturel du vin provenant essentiellement des résidus vinaires. On le trouve donc sous la forme L(+). Habituellement, il cristallise sous une forme tétrahydratée.

Produit qui favorise le déclenchement de la précipitation du tartrate de calcium naturel du vin par la technique d'ensemencement.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

Acide tartrique	57,7
Calcium	15,4
Eau	27,9

4. CARACTERES

Poudre fine cristalline, de couleur blanche à blanc cassé. Insipide.

Point de fusion 270°C.

5. SOLUBILITE

Eau à 20°C	0,525 g/l
Alcool à 95 % vol.	0,15 g/l
Ether éthylique	0,01 g/l

6. ESSAIS

6.1 Pouvoir rotatoire

Dissoudre 1 g de substance dans un litre d'acide chlorhydrique 1 M.

Après dissolution totale, on trouve

$$[\alpha]_D^{20°C} = + 7,2 \pm 0,2 \text{ degrés.}$$

Le pouvoir rotatoire est sensible aux faibles variations de pH.

6.2 pH en solution saturée

Introduire 1 g de produit dans 100 ml d'eau distillée. Après agitation durant une heure et redéposition du précipité (15 minutes), on doit observer une augmentation de pH comprise entre 1,5 et 2,5 unités pH.

6.3 Perte à la dessiccation

Elle est déterminée jusqu'à poids constant sur une prise d'essai exactement pesée voisine de 1 g, à une température comprise entre 100 °C et 105°C, la perte de poids doit être inférieure ou égale à 2,5 p. 100.

6.4 Préparation de la solution pour essais

Dissoudre une prise d'essai exactement pesée voisine de 1 g dans 100 ml d'acide chlorhydrique 1 M.

6.5 Sulfates

Prélever 10 ml de la solution préparée pour essais (6.4)et lui ajouter 1 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R). Après homogénéisation, laisser reposer 15 minutes. Aucun trouble ne doit apparaître ou alors, il est inférieur à celui d'un témoin préparé selon la méthode en annexe. (Teneur en sulfates, exprimée en acide sulfurique, inférieure à 1 g/kg).

6.6 Métaux lourds

A 10 ml de la solution préparée pour essais (6.4),ajouter 0,5 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (R), 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R) et 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). (Teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

6.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (6.4), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

6.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (6.4), doser le mercure à l'aide de la méthode décrite en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

6.9 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (6.4), doser l'arsenic à l'aide de la méthode décrite en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

6.10 Dosage des résidus basiques

Dissoudre une prise d'essai, **p**, de tartrate de calcium tétrahydrate, exactement pesée et voisine de 0,5 g dans 25 ml d'acide chlorhydrique 1 M (R). Porter à l'ébullition, sous reflux, et laisser refroidir. Titrer l'excès d'acide par une solution d'hydroxyde de sodium 1 M (R) en présence de rouge de méthyle (R). Soit **n**, le nombre de millilitres de solution d'hydroxyde de sodium 1 M utilisés ; 1 ml de solution d'acide chlorhydrique 1 M équivalent à 0,05005 g de carbonate de calcium. La teneur en p. 100 exprimée en carbonate de calcium est :

$$\frac{(25-n)\ .\ 5{,}005}{\mathbf{p}}$$

Le produit oenologique doit contenir au maximum 3 p. 100 de résidus basiques exprimés en carbonate de calcium.

1. CONSERVATION

Le tartrate de calcium doit être conservé à l'abri de l'humidité, dans des récipients hermétiquement clos.

SULFATE DE CALCIUM
$CaSO_4 \cdot 2\ H_2O$ (dihydraté)
N° CAS : 10101-41-4

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce produit est utilisé pour l'acidification des moûts dans la production de vins de liqueur. Le sulfate de calcium additionné réagit avec les ions tartrate du moût, produisant du tartrate de calcium insoluble et libérant des ions sulfate dans le moût. Ce phénomène entraîne des modifications de l'équilibre ionique qui se traduisent par une libération de protons et une diminution du pH sans augmentation de l'acidité titrable.

2. ÉTIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la nature du sulfate de calcium, le numéro de lot et les conditions de sécurité et de conservation.

3. COMPOSITION STŒCHIOMÉTRIQUE

$CaSO_4$: 79,1 %

H_2O : 20,9 %

4. CARACTÈRES

Le sulfate de calcium dihydraté se présente sous la forme d'une poudre blanche amorphe. Il ne doit pas être confondu avec la forme anhydre, très hygroscopique et qui se solidifie au contact du moût.

5. SOLUBILITÉ

Peu soluble dans l'eau et soluble dans les solutions d'acides chlorhydrique, sulfurique et nitrique.

6. ESSAIS

6.1. Perte à la dessiccation

Eau non liée : peser 50 g de sulfate de calcium dans une capsule. Placer dans une étuve à 40 °C jusqu'à poids constant. La perte de poids ne doit pas être supérieure à 2 %.

Eau non liée et liée : placer un autre échantillon dans une étuve à 200 °C pendant 4 heures. La perte de poids totale ne doit pas être supérieure à 23 %.

6.2. Préparation de la solution pour essais

Peser 10 g de sulfate de calcium. Dans un Erlenmeyer de 500 mL pouvant être bouché hermétiquement, placer 200 mL de solution d'acide tartrique à 5 g/L et ajuster à pH 3 avec du HCl 0,1 N. Placer l'Erlenmeyer sur un agitateur magnétique, verser en pluie le sulfate de calcium et agiter pendant 1 heure à une température de 20 ± 2 °C. Laisser reposer et filtrer en éliminant les premier 50 mL de filtrat. Recueillir au moins 100 mL de liquide clair.

6.3. Plomb

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser le plomb selon la méthode décrite dans le *Recueil*. La teneur en plomb dans le sulfate de calcium doit être inférieure à 2 mg/kg.

6.4. Mercure

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser le mercure selon la méthode décrite dans le *Recueil*. La teneur en mercure dans le sulfate de calcium doit être inférieure à 1 mg/kg.

6.5. Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser l'arsenic selon la méthode décrite dans le *Recueil*. La teneur en arsenic dans le sulfate de calcium doit être inférieure à 3 mg/kg.

6.6. Fer

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser le fer selon la méthode décrite dans le *Recueil*. La teneur en fer doit être inférieure à 200 mg/kg.

6.7. Dosage

Le dosage peut être réalisé en utilisant toute méthode incluse dans le Recueil. En cas d'utilisation de la méthode gravimétrique OIV-MA-AS321-05A, suivre le mode opératoire suivant : peser 250 mg de l'échantillon séché à 40 °C avec une précision de 1 mg et les dissoudre dans 10 mL d'HCl 1 M. Prélever 5 mL de cette solution et additionner 0,5 mL d'HCl 2 M et 1,5 mL d'une solution de Ba Cl2 à 400 g/L ; agiter avec une baguette de verre ; rincer la baguette avec un peu d'eau distillée et laisser reposer 5 min. Centrifuger pendant 5 min à 3000 tr/min, puis décanter avec

précaution le liquide surnageant. Laver le précipité de sulfate de baryum de la manière suivante : additionner 10 mL d'acide chlorhydrique 2 M, mettre le précipité en suspension et centrifuger pendant 5 min à 3000 tr/min, puis décanter soigneusement le liquide surnageant. Répéter deux fois la procédure de lavage dans les mêmes conditions avec 15 mL d'eau distillée à chaque fois. Transvaser quantitativement le précipité en le rinçant avec de l'eau distillée dans une capsule de platine tarée et la placer sur un bain d'eau à 100 °C jusqu'à évaporation à sec. Le précipité desséché est calciné plusieurs fois brièvement sur flamme jusqu'à obtention d'un résidu blanc. Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser.

7. Calculs

Teneur en sulfate de calcium dihydraté dans le produit (%) = $\boldsymbol{p} \times 0{,}59021$

où $\boldsymbol{p}$ est la masse de $BaSO_4$ mesurée en mg.

Si une autre méthode d'analyse des sulfates du *Recueil* est utilisée pour analyser la solution initiale de sulfate de calcium préparée pour le dosage :

Teneur en sulfate de calcium dihydraté dans le produit (%) = $\boldsymbol{c} \times 3{,}9522\ 10^{-3}$

où $\boldsymbol{c}$ est la concentration en sulfates en mg/L de K_2SO_4.

Le produit œnologique doit contenir au minimum 90 % de sulfate de calcium.

8. CONSERVATION

Le sulfate de calcium doit être conservé dans des récipients hermétiquement clos à l'abri de l'humidité et de substances volatiles qu'il pourrait adsorber.

CARAMEL
N° SIN : 150
(Oeno 20/2004)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le caramel se présente sous forme liquide ou solide brun foncé à noir ; il n'est pas admis pour colorer le vin *stricto sensu* mais peut être utilisé comme colorant pour certains vins de liqueur, boissons spiritueuses d'origine vitivinicole et boissons à base de vin.

2. DEFINITIONS

CARAMEL (OU CARAMEL ORDINAIRE) (Classe I) (SIN : 150a)

Le caramel (ou caramel ordinaire) est préparé par chauffage contrôlé d'hydrates de carbone constitués des monomères glucose et fructose et/ou de leurs polymères (par exemple : sirop de glucose, saccharose et/ou sirops de sucres invertis). Pour favoriser la caramélisation, on peut employer des acides, des bases et des sels à l'exception des composés ammoniaqués.

CARAMEL DE SULFITE CAUSTIQUE (Classe II) (SIN : 150b)

Le caramel de sulfite caustique est préparé par chauffage contrôlé d'hydrates de carbone définis pour le caramel ordinaire, avec ou sans acides ou bases, en présence de composés de sulfites (acide sulfureux, sulfite de potassium, hydrogénosulfite de potassium, sulfite de sodium et hydrogénosulfite de sodium) ; aucun composé ammoniaqué n'est utilisé.

CARAMEL AMMONIACAL (Classe III) (SIN : 150c)

Le caramel ammoniacal est préparé par chauffage contrôlé d'hydrates de carbone définis pour le caramel ordinaire, avec ou sans acides ou bases, en présence de composés d'ammonium (hydroxyde d'ammonium, carbonate d'ammonium, hydrogénocarbonate d'ammonium et phosphate d'ammonium) ; aucun composé de sulfite n'est utilisé.

CARAMEL AU SULFITE D'AMMONIUM (Classe IV) (SIN : 150d)

Le caramel au sulfite d'ammonium est préparé par chauffage contrôlé d'hydrates de carbone définis pour le caramel ordinaire, avec ou sans acides ou bases, en présence des composés de sulfite et d'ammonium (acide sulfureux, sulfite de potassium, hydrogénosulfite de potassium, sulfite de sodium, hydrogénosulfite de sodium, hydroxyde d'ammonium, carbonate

d'ammonium, hydrogénocarbonate d'ammonium, phosphate d'ammonium, sulfate d'ammonium, sulfite d'ammonium et hydrogénosulfite d'ammonium).

3. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de conservation.

4. ESSAIS

4.1 Intensité de la coloration

L'intensité de la coloration est définie comme étant l'absorbance d'une solution aqueuse de caramel à 0,1 p. 100 (m/v) mesurée dans une cuve de 1 cm de parcours optique à la longueur d'onde de 610 nm.

4.2 Azote total

A partir de 2 g exactement pesé de caramel appliquer la méthode décrite Chapitre II du Codex œnologique international.

4.3 Préparation de la solution pour essais

Placer 2 g de caramel dans une capsule ; laisser à l'étuve à 105°C pendant 4 heures puis incinérer avec précaution sans dépasser 550°C. Reprendre les cendres par 10 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R). Chauffer légèrement et transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml en rinçant la capsule avec de l'eau et compléter au trait de jauge.

4.4 Métaux lourds

A 10 ml de la solution pour essais préparée selon le point 4.3, ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R) et 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Si une coloration brune apparaît, elle doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué au Chapitre II du Codex œnologique international.

4.5 Plomb

Sur la solution pour essais préparée selon le point 4.3, doser le plomb suivant la méthode figurant au Chapitre II du Codex œnologique international.
Se reporter au point 5 pour les teneurs maximales.

4.6 Mercure

Doser le mercure à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.
Se reporter au point 5 pour les teneurs maximales.

4.7 Cadmium

Sur la solution pour essais préparée selon le point 4.3, doser le cadmium à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

Se reporter au point 5 pour les teneurs maximales.

4.8 Arsenic

Sur la solution pour essais préparée selon le point 4.3, doser l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.
Se reporter au point 5 pour les teneurs maximales.

4.9 Matière colorante retenue sur DEAE cellulose

Voir la méthode décrite par le JEFCA publiée au Compendium of food additives specifications, FAO Food and Nutrition Paper 52 Add. 8.

4.10 Matière colorante retenue sur phosphorylcellulose

Voir la méthode décrite par le JECFA publiée au Compendium of food additives specifications, FAO Food and Nutrition Paper 52 Add. 8.

4.11 4-Méthylimidazole

Voir méthode décrite par le JECFA publiée au Compendium of food additives specifications, FAO Food and Nutrition Paper 52 Add. 8.

4.12 2-Acétyl-4-tétrahydroxybutylimidazole

Voir méthode décrite par le JECFA publiée au Compendium of food additives specifications, FAO Food and Nutrition Paper 52 Add. 8.

4.13 Soufre total

Voir méthode décrite par le JECFA publiée au Compendium of food additives specifications, FAO Food and Nutrition Paper 52 Add. 8.

4.14 Dioxyde de soufre

La méthode utilisée est celle figurant dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'O.I.V.

5. SPECIFICATIONS PARTICULIERES

5.1 Caramel Ordinaire

Matière colorante retenue sur DEAE cellulose	Pas plus de 50 %
Matière colorante retenue sur phosphorylcellulose	Pas plus de 50 %
Intensité de la coloration	0,01-0,12
Azote total	Pas plus de 0,1 %
Soufre total	Pas plus de 0,3 %
Arsenic	Pas plus de 1 mg/kg
Plomb	Pas plus de 2 mg/kg
Mercure	Pas plus de 1 mg/kg
Cadmium	Pas plus de 1 mg/kg
Métaux lourds (exprimés en Pb)	Pas plus de 25 mg/kg

5.2 Caramel de sulfite caustique

Matière colorante retenue sur DEAE cellulose	Plus de 50 %
Intensité de la coloration	0,06-0,10
Azote total	Pas plus de 0,2 % (1)
Dioxyde de soufre total	Pas plus de 0,2 % (1)
Soufre total	1,3-2,5% (1)
Soufre retenu sur DEAE cellulose	Plus de 40 %
Pourcentage de densité optique de la coloration retenue sur DEAE cellulose	19-34
Rapport des DO 280/560	Supérieur à 50
Arsenic	Pas plus de 1 mg/kg
Plomb	Pas plus de 2 mg/kg
Mercure	Pas plus de 1 mg/kg
Cadmium	Pas plus de 1 mg/kg
Métaux lourds (exprimés en plomb)	Pas plus de 25 mg/kg

(1) Exprimé par rapport à une intensité de coloration équivalente, c'est-à-dire par rapport à un produit ayant une intensité de coloration de 0,1 unité d'absorption.

5.3 Caramel ammoniacal

Matière colorante retenue sur DEAE cellulose	Pas plus de 50 %
Matière colorante retenue sur phosphorylcellulose	Plus de 50 %
Intensité de la coloration	0,08-0,36
Azote ammoniacal	Pas plus de 0,4 % (1)
4-Méthylimidazole	Pas plus de 250 mg/kg(1)
2-Acétyl-4-tétrahydroxybutylimidazole	Pas plus de 10 mg/kg (1)
Soufre total	Pas plus de 0,3 % (1)
Azote total	1,3-6,8% (1)
Pourcentage de densité optique de la coloration retenue sur phosphorylcellulose	13-35
Arsenic	Pas plus de 1 mg/kg
Plomb	Pas plus de 2 mg/kg
Mercure	Pas plus de 1 mg/kg
Cadmium	Pas plus de 1 mg/kg
Métaux lourds (exprimés en plomb)	Pas plus de 25 mg/kg

([1]) Exprimé par rapport à une intensité de coloration équivalente, c'est-à-dire par rapport à un produit ayant une intensité de coloration de 0,1 unité d'absorption.

5.4 Caramel au sulfite d'ammonium

Matière colorante retenue sur DEAE cellulose	Plus de 50 %
Intensité de la coloration	0,10-0,60
Azote ammoniacal	Pas plus de 2,8 % (1)
Dioxyde de soufre	Pas plus de 0,5 % (1)
4-Méthylimidazole	Pas plus de 250 mg/kg(1)
Azote total	0,5-7,5% (1)
Soufre total	1,4-10,0% (1)
Rapport azote/soufre du précipité par l'alcool	0,7-2,7
Rapport des DO du précipité par l'alcool (2)	8-14
Rapport des DO 280/560	Pas plus de 50 (2)
Arsenic	Pas plus de 1 mg/kg
Plomb	Pas plus de 2 mg/kg
Mercure	Pas plus de 1 mg/kg
Cadmium	Pas plus de 1 mg/kg
Métaux lourds (exprimés en plomb)	Pas plus de 25 mg/kg

([1]) Exprimé par rapport à une intensité de coloration équivalente, c'est-à-dire par rapport à un produit ayant une intensité de coloration de 0,1 unité d'absorption.
([2]) Le rapport des densités optiques du précipité par l'alcool est défini comme la densité optique du précipité à 280 nm divisée par la densité optique à 560 nm (dans une cuve de 1 cm).

6. CONSERVATION

Le caramel doit être conservé en récipient fermé.

7. REFERENCES

- Directive 95/45/CE Journal officiel des Communautés européennes, L 226, 22 septembre 1995.
- Compendium of food additive specifications Addendum 8, FAO Food and Nutrition Paper 52 Add. 8., Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ISBN 92-5-104508-9.

DIOXYDE DE CARBONE
Carbonique (anhydride)
Gaz carbonique
Carbonei dioxydum
CO_2 = 44,0l
N° SIN: 290
(Oeno 26/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le dioxyde de carbone est utilisé pour les opérations d'"inertage" sous forme de gaz pur ou en mélange avec l'azote.

2. ETIQUETAGE

La nature du gaz et sa pureté doivent être indiquées sur l'étiquetage, y compris en cas de mélange, les conditions de sécurité doivent aussi être indiquées sur les emballages.

3. CARACTERES

Le dioxyde de carbone est un gaz incolore, inodore ; sa solution aqueuse présente une saveur faiblement acide. A la température de 0°C et sous la pression de 760 mm de mercure, 1 l de dioxyde de carbone pèse 1,977 g.

A la température de 20°C et sous la pression de 760 mm de mercure, 1 l d'eau dissout 878 ml de dioxyde de carbone, soit 1,736 g CO_2.

Lorsqu'on introduit une flamme dans un tube contenant de dioxyde de carbone, la flamme s'éteint.

Remplir de dioxyde de carbone une éprouvette de 50 ml ; agiter avec 10 ml de solution d'hydroxyde de baryum : il se forme un précipité blanc qui est solubilisable par l'acide acétique dilué à 10 p. 100 (R) avec effervescence.

4. ESSAIS

La pureté globale du dioxyde de carbone doit atteindre 99 p. 100 en volumes.

La recherche et le dosage des impuretés gazeuses peuvent être effectués par chromatographie en phase gazeuse (méthode donnée en annexe).

Le contrôle du dioxyde de carbone peut aussi être effectué par les essais chimiques suivants.

Pour les déterminations ci-après, les tubes contenant du dioxyde de carbone doivent avoir été maintenus pendant 6 heures au moins préalablement au prélèvement, à la température ambiante ; les volumes à prélever sont calculés en tenant compte de la température et de la pression, en fonction de ceux qui sont indiqués pour 0°C et 760 mm de mercure.

4.1 Acide sulfureux et dioxyde de soufre

Faire passer pendant 15 minutes, à vitesse constante, 1000 ml de dioxyde de carbone dans 50 ml d'eau récemment bouillie et refroidie à la température de la pièce ; la tubulure d'arrivée doit avoir un orifice de 1 mm environ de diamètre et plonger jusqu'à 2 mm du fond du récipient contenant l'eau, sous une hauteur de 12 à 14 cm. Après le passage du gaz, verser le liquide dans le godet **A** d'un comparateur et ajouter 0,05 ml de solution de méthylorange (R). Dans le second godet **B** contenant 50 ml d'eau récemment bouillie et froide, ajouter 1 ml de solution 0,01 M d'acide chlorhydrique, puis 0,05 ml de solution de méthylorange (R). Le liquide du godet **A** ne doit pas présenter une teinte rouge plus foncée que celle présentée par le liquide du godet **B**.

4.2 Hydrogène sulfuré, hydrogène phosphoré, hydrogène arsénié et matières organiques réductrices

Faire passer, dans des conditions analogues à celles de l'essai précédent 1 000 ml de dioxyde de carbone dans un mélange de 10 ml de solution de nitrate d'argent ammoniacal (R), 3 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (R) et 15 ml d'eau distillée ; il ne doit se produire ni trouble, ni brunissement par comparaison avec une même solution témoin à travers laquelle le gaz ne sera pas passé.

4.3 Oxygène

Transpercer le bouchon d'un flacon pour recherche de l'oxygène (voir "Azote"), par une aiguille de 8/10 de millimètre pour injections hypodermiques (prendre soin de ne pas faire plonger celle-ci dans le liquide) qui servira ensuite à l'évacuation du gaz après barbotage. Introduire ensuite une deuxième aiguille de même diamètre amenant le gaz détendu et la faire plonger dans le liquide. Après une minute de barbotage, on ne doit pas observer de coloration appréciable. En présence d'oxygène, le liquide vire rapidement au bleu et la couleur s'intensifie avec le temps.

4.4 Monoxyde de carbone

La teneur limite en monoxyde de carbone déterminée selon la méthode en annexe est de 10µl/l.

4.5 Huile

La teneur limite en huile exprimée par la quantité absorbée par un piège adéquat selon la méthode décrite en annexe est de 0,1mg/l.

4.6 Dosage

Dans une jauge à gaz graduée et retournée sur une cuve à mercure ou dans une burette à gaz graduée pleine de mercure, introduire un volume voisin de 100 ml de dioxyde de carbone exactement mesuré. Soit sur la cuve à mercure à l'aide d'une pipette à bout recourbé, soit en exerçant une pression de mercure avec un dispositif convenable, faire passer le gaz dans un tube ou dans un réservoir absorbeur renfermant une quantité suffisante d'une solution aqueuse contenant 40 g d'hydroxyde de potassium (R) pour 100 ml. Agiter pendant 5 minutes de façon à assurer un contact efficace entre le liquide et le gaz. Faire passer à nouveau le gaz débarrassé du liquide aqueux dans la jauge graduée ou dans la burette. Procéder alors à la lecture du volume résiduel à la même température et sous la même pression que lors de la mesure de la prise d'essai. Mettre une nouvelle fois le gaz résiduel en contact avec la solution alcaline et vérifier par une seconde lecture du volume résiduel que l'absorption a été totale. Il ne doit pas rester plus de 1 p. 100 de gaz non absorbable.

5. CONSERVATION

Le dioxyde de carbone est conservé dans des cylindres d'acier peints en gris. La résistance de ces cylindres doit être contrôlée périodiquement.

CASEINES
(Caséine lactique ou aux acides)
Caseina
(Oeno 12/2003, Oeno 555-2015)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La caséine, hétéroprotéine qui contient du phosphore, se trouve dans le lait à l'état de sel calcique.

Elle est obtenue par la coagulation du lait écrémé.

Agent de collage indiqué pour le traitement des oxydations des vins. Elle ne peut être mise en œuvre que dans de l'eau alcalinisée ou additionnée à du carbonate de potassium ou à de l'hydrogénocarbonate de potassium.

La caséine adsorbe les polyphénols, notamment les polyphénols oxydés.

2. ETIQUETAGE

La concentration de la caséine ayant servi à la préparation doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de conservation.

3. CARACTERES

La caséine se présente en poudre de couleur blanc jaunâtre, amorphe, insoluble dans l'eau pure et les divers solvants organiques. Elle peut présenter une légère odeur lactée. Dans l'eau alcalinisée ou dans les solutions de sels à réaction alcaline, elle se gonfle et donne une solution colloïdale : 100 ml d'eau alcalinisée par 1 g d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium dissolvent, dans un bain d'eau à 100 °C, 10 g de caséine. Cette solution diluée par 20 fois son volume d'eau est trouble ; elle doit être exempte de grumeaux.

Les caséines dites solubles sont des mélanges de poudre pure et/ou de carbonate de potassium (maximum 20 p. 100), ou d'hydrogénocarbonate de potassium.

Les caséines mises en œuvre en œnologie sont de qualité alimentaire.

4. CARACTERES D'IDENTITE

4.1 La caséine ne précipite pas par chauffage de sa solution alcaline. Cette solution précipite par acidification dès que le pH est inférieur à 5.

4.2 Les cendres de la caséine contiennent des phosphates caractérisés par le réactif nitromolybdique (R).

5. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

La caséine doit être sans saveur, ni odeur anormale (rance, moisi, putride, etc...).

5.1 Acidité

5.1.1 Principe

Détermination de l'acidité libre dans la caséine par dosage acido-basique d'un extrait aqueux du produit.

5.1.2 Réactifs

- Hydroxyde de sodium 0,1 M
- Phénolphtaléine, solution à 10 g/l dans de l'éthanol

5.1.3 Mode opératoire

Test préalable :

- Homogénéiser le produit en agitant fortement ;
- Passer 50 g de produit sur un tamis (tamis en toile métallique de 200 mm de diamètre, de 500 µm de dimension nominale d'ouverture et muni d'un réceptacle (Norme ISO 3310/1) ;
- Si les 50 g de produit passent entièrement utiliser le produit tel quel
- Si les 50 g de produit ne passent pas, broyer le produit jusqu'à ce que la totalité des 50 g passe.

Pendant toutes ces opérations, éviter la modification de la teneur en eau du produit.

Préparation de la solution pour essai :

- Prélever environ 10 g à 10 mg près sur les 50 g passés au tamis, soit m cette masse
- Placer la masse m dans une fiole conique de 250 ml
- Ajouter dans la fiole 200 ml d'eau distillée récemment bouillie et porter à 60 °C
- Agiter la fiole bouchée

- Laisser reposer environ 30 mn sur un bain d'eau à 60 °C en agitant la fiole toutes les 10 mn
- Filtrer

Le filtrat à 20 °C doit être limpide.

Réalisation de l'essai :

- Prélever 100 ml de filtrat
- Placer cette prise d'essai dans une fiole conique de 250 ml
- Ajouter dans la fiole 0,5 ml de solution de phénolphtaléine
- Titrer à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M
- Soit V le volume utilisé.

5.1.4 Calcul

L'acidité libre dans la caséine exprimée en meq/l est égale à :

$$\frac{20 \cdot V \cdot T}{m}$$

- V est le volume, en ml, d'hydroxyde de sodium utilisé
- T est le titre molaire exact de la solution d'hydroxyde de sodium
- m est la masse, en g, de la prise d'essai.

L'acidité, exprimée en acide lactique, devra être inférieure à 1,6 g/l.

5.2 pH

Agiter 10 g de caséine dans 100 ml d'eau pendant quelques minutes. Décanter ; le pH de la solution doit être inférieur ou égal à 5 pour la caséine pure.

5.3 Perte à la dessiccation

Déterminée jusqu'à poids constant, sur une prise d'essai de 2 g, la perte de poids, à 100-105 °C, de la caséine doit être inférieure à 12 p. 100.

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

5.4 Cendres

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

Le taux de cendres doit être inférieur à 3 p. 100 pour la caséine acide et inférieur à 23% pour le mélange caséine acide et carbonate de potassium ou hydrogénocarbonate de potassium.

5.5 Préparation de la solution pour essais

Après la pesée des cendres, les dissoudre dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau. Chauffer pour activer la dissolution et ajouter de l'eau jusqu'à obtention d'un volume égal à 25 fois le poids de caséine sèche. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0,04 g de caséine sèche.

5.6 Fer

Prélever 10 ml de la solution préparée pour essais (5.5), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), 3 gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène à 3 volumes (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

Si une coloration rouge apparaît, elle doit être moins intense que celle d'un témoin préparé avec 8 ml de solution de fer(III) à 0,01 g de fer par litre (R), 2 ml d'eau et les mêmes volumes d'acide chlorhydrique concentré (R) et de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

La teneur en fer doit être inférieure à 200 mg/kg.

Cette détermination peut également être effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique.

5.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5.5), effectuer le dosage du plomb selon la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.

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

5.8 Cadmium

Sur la solution préparée pour essais (5.5), effectuer le dosage du cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.

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

5.9 Mercure

Effectuer le dosage du mercure à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

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

5.10 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5.5), effectuer le dosage de l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

5.11 Azote total

Introduire environ 0,20 g de caséine exactement pesée dans un matras de minéralisation avec 15 ml d'acide sulfurique concentré (R) et 2 g de catalyseur de minéralisation (R) et poursuivre l'opération selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur en azote total doit être supérieure à 13 p. 100.

5.12 Protéines

La teneur en protéines ne peut être inférieure à 82 p. 100 en poids (azote total 6,38).

5.13 Matières grasses

Déterminer la teneur en matières grasses par la méthode gravimétrique Schmid-Bondzynski-Ratslaff norme ISO 5543.

La teneur en matières grasses doit être inférieure à 2 p. 100.

5.14 Contrôle bactériologique

Procéder comme il est indiqué au chapitre II du Codex Œnologique international.

Limite : micro-organismes viables totaux : moins de 3×10^4 UFC/g.

5.15 Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

5.16 Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le nombre en staphylocoques (ß-hémolytiques à coagulase positive) doit être inférieur ou égal à 1 par g.

5.17. *Escherichia Coli*

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

5.18 Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le nombre de salmonelles doit être inférieur à 1 pour 100 g.

5.19 Levures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation.

5.20 Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur limite : 10^2 UFC/g de préparation.

5.21 *Lactobacillus sp.*[3]

Teneur limite : 10 UFC/g de préparation.

5.22 *Pediococcus sp.*[4]

Teneur limite : absence dans un échantillon de 10 g de préparation.

5.23 Bactéries acétiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation.

5.24 Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur limite **:** 10^3 UFC/g de préparation.

6. CONSERVATION

La caséine doit être conservée dans des sacs étanches à une température comprise entre 5 et 20°C et avec une humidité relative inférieure à 65 p 100. Sa durée de conservation est de 24 mois.

7. REFERENCES

Norme ISO 5543.

[3] *Méthode à définir ultérieurement*

[4] *Méthode à définir ultérieurement*

RESINES ECHANGEUSES DE CATIONS
(Oeno 43/2000)

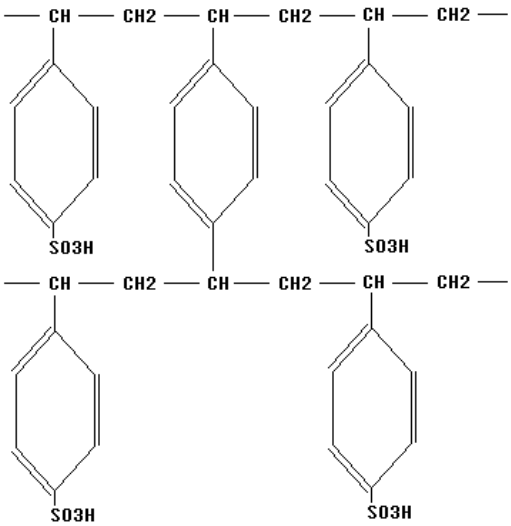
1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'échange d'ions est l'échange réversible d'ions entre un liquide et un solide, au cours duquel le solide ne subit pas de changements substantiels. Quand on applique cette technologie au vin, le solide est une résine synthétique insoluble, perméable, qui peut échanger des ions avec le vin avec lequel elle est en contact. Les résines sont utilisées pour la stabilisation tartrique des vins

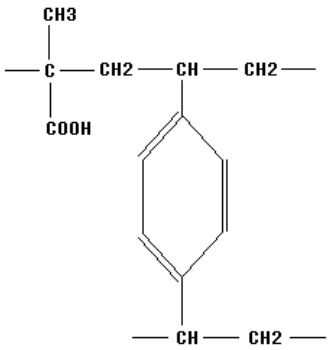
2 COMPOSITION

Les résines échangeuses de cations peuvent être préparées sous une forme physique appropriée utilisant une ou plusieurs des formules suivantes

1. Copolymère sulfoné de styrène et de divinylbenzène :



2. Copolymère de divinylbenzène et d'acide méthacrylique :



L'inertie des résines doit être satisfaite.

Les substances qui peuvent être utilisées dans la fabrication de ces résines sont indiquées dans les Annexes 1 et 2

La résine ne devra pas contenir plus de 1 mg de substances organiques extractives par kg, ces extraits organiques étant obtenus avec chacun des solvants suivants : (a) l'eau distillée, (b) alcool à 15 % vol., (c) solution d'acide acétique à 3 % (m/m).

La résine aura été lavée et conditionnée selon les instructions du fabricant.

Préparer différentes colonnes échangeuses d'ions séparées pour chaque solvant, en utilisant 50 ml de résine dont on aura déterminé le poids.

Tout en maintenant la température maximale qui pourra être rencontrée lors de l'utilisation, passer à travers les résines, à un débit de 350 - 450 ml par heure, respectivement, les trois solvants d'analyses, l'eau distillée, la solution hydro-alcoolique à 15 % vol. et la solution d'acide acétique à 3 p. 100 (m/m).

Le premier litre d'effluent de chaque solvant n'est pas pris en compte, seuls les deux litres suivants de chaque solvant sont utilisés pour déterminer les extraits organiques.

Extrait total : L'échantillon de deux litres est évaporé à 105°C jusqu'à poids constant..

Cendres : Le résidu sec de l'évaporation des 2 l d'effluent est ensuite calciné dans un four à 850°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

Extrait organique : L'extrait total moins les cendres donne l'extrait organique ; s'il est supérieur à une 1 mg/l du solvant utilisé, un "blanc" devrait être effectué sur le solvant, et une correction devrait être faite par la soustraction de l'extrait organique trouvé dans le "blanc" de celui obtenu dans le test de résine. Les solvants utilisés sont préparés comme suit:

Réactifs de contrôle

Eau distillée et/ou désionisée.

Alcool éthylique à 15 % vol. obtenu à partir d'alcool éthylique absolu et d'eau distillée et/ou désionisée.

Acide acétique à 3 % réalisé par un mélange de 3 parties, en masse, d'acide acétique avec 97 parties en masse d'eau distillée et/ou désionisée.

3. LIMITES

- Le traitement ne doit pas changer le caractère du vin.

- Le traitement ne doit pas diminuer la couleur du vin.

- Le traitement ne doit pas diminuer la concentration des cations métalliques dans le vin en dessous de 300 mg/l.

- Le traitement ne doit pas abaisser le pH du vin en dessous de 3,0. La diminution de pH ne doit pas excéder 0,3 unités pH.

- La résine ne doit pas donner au vin des matières ou caractéristiques (dues au traitement de la résine) qui normalement n'existent pas dans le vin.

L'opérateur peut utiliser des agents conditionnants et/ou régénérants composés d'eau et d'acides inorganiques, bases ou sels à condition que la résine conditionnée ou régénérée soit rincée à l'eau jusqu'à élimination complète des agents conditionnants et régénérants avant l'introduction du vin.

Annexe 1

Substances utilisables dans la fabrication des résines échangeuses d'ions servant au conditionnement des denrées alimentaires

Liste 1
Substances évaluées par un organisme international

NOM	PM/REF	CAS	RESTRICTIONS
Monomères et autres substances de départ			
Acrylate de n-butyle	10780	00141-32-2	-
Acrylate d'éthyle	11470	00140-88-5	-
Acrylate de méthyle	11710	00096-33-3	-
Acrylonitrile	12100	00107-13-1	LMS = non décelable (LD = 0,02 mg/kg)
Formaldéhyde	17260	00050-00-0	LMS = 15 mg/kg
Méthacrylate de méthyle	21130	00080-62-6	-
Méthanol	21550	00067-56-1	-
Styrène	24610	00100-42-5	-
Modificateurs chimiques			
Acide carbonique, sels	42500	-	-
Acide chlorhydrique	59990	07647-01-0	-
Acide phosphorique	72640	07664-38-2	-
Acide silicique, sels	85980	-	-
Acide sulfurique	91920	07664-93-9	-
Anhydride acétique	10150	00108-24-7	-
tert-Butyl-4-hydroxyanisole (=BHA)	40720	25013-16-5	LMS = 30 mg/kg
Diéthylènetriamine	15790	00111-40-0	LMS = 5 mg/kg
Diméthylamine	49225	00124-40-3	LMS = 0,06 mg/kg
2-(Diméthylamino)éthanol	49235	00108-01-0	LMS = 18 mg/kg
Formaldéhyde	54880	00050-00-0	LMS = 15 mg/kg
Hexaméthylènediamine	18460	00124-09-4	LMS = 2,4 mg/kg
Hydroxyde de potassium	81600	01310-58-3	-
Hydroxyde de sodium	86720	01310-73-2	-
Nitrite de sodium	86920	07632-00-0	LMS = 0,6 mg/kg
Oxyde d'éthylène	17020	00075-21-8	QM = 1 mg/kg de PF
2-Propanol	81882	00067-63-0	-
Adjuvants de polymérisation			
Acides alkylsulfoniques (C_8-C_{22})		34230-	LMS = 6 mg/kg
Acides alkylsulfurique~(C_8-C_{22}), linéaires, primaires, à nombre pair d'atomes de carbone	34281	-	-

Acide formique	55040	00064-18-6	-
Carboxyméthylcellulose	42640	09000-11-7	-
Chlorure d'étain (IV)	93420	07646-78-8	-
Chlorure de méthylène	66620	00075-09-2	LMS = 0,05 mg/kg
1,4-Dihydroxybenzène	48620	00123-31-9	LMS = 0,6 mg/kg
Gélatine	55440	09000-70-8	-
Hydroxyde d'ammonium	35600	01336-21-6	-
Hydroxyde de magnésium	64640	01309-42-8	-
Hydroxyéthylcellulose	60560	09004-62-0	-
Hydroxéthylméthylcellulose	60880	09032-42-2	-
Méthanol	65960	00067-56-1	-
Méthylcarboxyméthylcellulose	66200	37206-01-2	-
Méthylisobutylcétone	66725	00108-10-1	LMS = 5 mg/kg
Toluène	93540	00108-88-3	LMS = 1,2 mg/kg

Annexe 2

Substances provisoirement utilisables dans la fabrication des résines échangeuses d'ions.

Liste 2

1. Substances non évaluées complètement par un organisme international

NOM	PMEF	CAS	RESTRICTIONS
Monomères et autres substances de départ			
Diméthacrylate d'éthylèneglycol	20440	00097-90-5	-
Divinylbenzène	16690	01321-74-0	-
Ether diallylique du 1, 1, 1 -triméthylolpropane	25645	00682-09-7	
Méthacrylate de 2,3-époxypropyle	20590	00106-91-2	-
2-Méthyl- 1,3-butadiène	21640	00078-79-5	-
1,7-Octadiène	22585	03710-30-3	-
Triméthacrylate du 1, 1, 1 -triméthylolpropane	25840	03290-92-4	
Modificateurs chimiques			
N,N-Diméthyl- 1,3-diaminopropane	49380	00109-55-7	
Triéthylamine	94270	00121-44-8	-
Triéthylènetétramine	25520	00112-24-3	-
Adjuvants de polymérisation			
Alcools polyvinyliques	81280	09002-89-5	-
4-tert-Butylcatéchol	40640	00098-29-3	-
Diisobutylcétone	49050	00108-83-8	-
Hypochlorite de sodium	62110	07681-52-9	-
Isobutanol	62270	00078-83-1	-
4-Méthoxyphénol	66030	00150-76-5	-
Méthylène bis (naphtalènesulfonate de sodium)	66600	26545-58-4	
4-Méthyl-2-pentanol	66860	00108-11-2	-
Peroxyde de dibenzoyle	46440	00094-36-0	-
Polyacétate de vinyle partiellement hydrolysé	81260	- -	

2. *Substances non évaluées par un organisme international*

NOM	PM/REF	CAS	RESTRICTIONS
Monomères et autres substances de départ			
Diméthoxyméthane	-	00109-87-5	-
Ether divinylique du diéthylèneglycol	-	00764-99-8	-
Ethylvinylbenzène	-	28106-30-1	-
1,2,4-Trivinyleyclohexane	-	02855-27-8	-
Modificateurs chimiques			
Acide chlorosulfonique	-	07790-94-5	-
Acide monochloroacétique	-	00079-11-8	-
Acide phosphoreux	-	13598-36-2	-
Brome	-	07726-95-6	-
2-Chloroéthanol	-	00107-07-3	-
Chlorure de méthyle	-	00074-87-3	-
1,2-Dichloroéthane	-	00107-06-2	-
1,2-Dichloropropane	-	00078-87-5	-
3-(Diméthylamino)propanol	-	03179-63-3	-
Ether chlorométhyl-méthylique	-	00107-30-2	-
Nitrobenzène	-	00098-95-3	-
Nitrite de potassium	-	07758-09-0	-
Phthalimide	-	00085-41-6	-
Trioxyde de soufre	-	07446-11-9	-
Triméthylamine	-	00075-50-3	-

*2. Substances non **évaluées par** un organisme international*

NOM	PM/REF	CAS	RESTRICTIONS
Adjuvants de polymérisation			
Acide lignosulfonique	63940	08062-15-5	-
Acide peracétique	-	00079-21-0	-
Acide polyacrylique	76460	09003-01-4	-
Acide poly(styrènesulfonique), sel de sodium	-	09080-79-9	-
Acrylamide - acide acrylique, copolymère	-	09003-06-9	-
tert-Alkylamines (C,2-CI4), ethoxylées, propoxylées		- 68603-58-7	-
Anhidryde maléique-styrène, copolymère, sel d'ammonium	-	26022-09-3	-
Attapulgite	-	12174-11-7	-
Azobisisobutyronitrile	-	00078-67-1	-
1J Bis (tert-butylperoxy)-3,3,5-triméthylcyclohexane	-	06731-36-8	-
n-Dodécyl mercaptan	-	00112-55-0	-
tert-Dodécyl mercaptan	-	25103-58-6	-
Ether monobutylique du poly(éthylène/propylene) glycol	-	09038-95-3	-
Ether octylphénylique du polyéthylèneglycol	78560	09002-93-1	-
Ether du poly(éthylène/propylène)glycol avec le 1, 1, 1 -triméthylolpropane	-	52624-57-4	-
tert-Hexadécyl mercaptan	-	25360-09-2	-
Hydropéroxyde de cumyle	-	00080-15-9	-
Isododécane	62405	31807-55-3	-
Isooctane	-	26635-64-3	-
Mono- et dialkyl (C_{IO}-C_{18}) sulfonamides	-	-	
Nitrate d'argent	-	07761-88-8	-
n-Octane	-	00111-65-9	-
Peracétate de tert-butyle	-	00107-71-1	-
Perbenzoate de tert-butyle	-	00614-45-9	-
Percarbonate de bis (4-tert-butylcyclohexyte)	-	15520-11-3	-
Per(2-éthylhexanoate) de tert-butyle	-	03006-82-4	-
Peroctanoate de tert-butyle	-	134,67-82-8	-
Peroxyde de dilauroyle	-	00105-74-8	-
Poly(chlorure de diallyldiméthylammonium)	-	26062-79-3	-
Polyvinylpyrrolidone	81500	09003-39-8	-

CHARBON ŒNOLOGIQUE

N° SIN : 153

OENO 7/2007

OIV-OENO 604-2018

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les charbons oenologiques sont d'origine végétale (généralement le bois) Afin d'augmenter leurs propriétés d'adsorption ils subissent une activation soit à haute température soit à température moins élevée en présence d'un acide (généralement l'acide phosphorique). Les charbons oenologiques ne doivent pas être activés en présence d'un catalyseur à base de métaux tel que le chlorure de zinc.

Ils se présentent sous forme d'une poudre noire très fine et légère ou de granulés.

Il existe également des préparations humides pour réduire l'empoussièrement. Dans ce cas, bien entendu, la perte en poids décrite ci- dessous en 3.1 peut atteindre 60 %.

Il peut également être aggloméré avec de la bentonite.

Les charbons à usage oenologique sont destinés à corriger les altérations dues à des champignons ainsi que la couleur des moûts blancs issus de raisins noirs ou tachés ou oxydés. Ils peuvent éliminer des anthocyanes et des polyphénols oxydés ou non mais aussi des polysaccharides. Les charbons sont utilisés pour corriger les caractères organoleptiques des moûts issus de raisins altérés par les champignons.

Les charbons œnologiques peuvent être aussi utilisés pour réduire la présence d'Ochratoxine A dans les moûts, les moûts en fermentations et dans les vins blancs.

Les charbons décolorants ont une activité désodorisante relativement faible. L'adsorption par les charbons est peu sélective, elle est fonction de leur structure, de leur porosité et de leur surface spécifique.

Il existe une limite concernant l'utilisation des charbons (exprimée en poids de charbon sec).

2. ETIQUETAGE

L'étiquette devra porter les conditions de conservation, la date limite d'utilisation pour les solutions humides, mentionner s'il existe une

réglementation concernant l'utilisation du produit, et préciser s'il s'agit d'un charbon décolorant ou désodorisant.

3. ESSAIS

3.1 Perte à la dessiccation

Placer 5 g de charbon dans une capsule de silice et porter le tout à 100°C dans une étuve. Après 3 heures de dessiccation, la perte de poids ne doit pas être supérieure à 20 p. 100. **Toutes les limites fixées pour le charbon sont rapportées au poids de charbon sec.**

3.2 Cendres

Incinérer le résidu sec précédemment obtenu à 550-600°C. Ces cendres ne doivent pas être supérieures à 10 p. 100.

Incinérer le résidu sec précédemment obtenu à 500-600 °C. Ces cendres ne doivent pas être supérieures à 10 %. Le taux de cendres du carbone aggloméré avec de la bentonite devrait être supérieur à 10 % et inférieur à 30 %.

3.3 Matières solubles dans les acides

Traiter à l'ébullition 5 g de charbon sec par 20 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 100 ml d'eau. Filtrer après refroidissement sur filtre serré ou sur membrane.

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

3.4 Chlorures

Agiter la quantité correspondant à 0,067 g de charbon sec avec 20 ml d'eau distillée. Filtrer. A 5 ml de filtrat, ajouter 5 ml d'acide nitrique dilué (R). Compléter à 20 ml et ajouter 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R).

Comparer l'opalescence ou le trouble éventuel à celui d'un témoin préparé comme il est indiqué au chapitre II. D'autres méthodes telle que la chromatographie ionique peuvent être utilisées. La teneur en chlorures ne doit pas être supérieure à 3 g/kg.

3.5 Cyanures

Placer dans une fiole conique de 100 ml, la quantité de charbon contenant 1 g de charbon sec, avec 10 ml d'acide sulfurique dilué (R). Adapter à la fiole conique un tube à dégagement plongeant

dans 2 ml environ de solution saturée de borax (R) placés dans un tube à essai. Distiller et recueillir 2 à 3 ml de distillat. Ajouter 5 gouttes d'une solution de anhydrosulfite de potassium à 2 p. 100 (R), laisser en contact pendant 5 minutes. Ajouter 1 ml de solution de sulfate de fer(□□) à 5 p. 100 (R), laisser en contact 15 minutes. Ajouter alors 2 gouttes de phénolphtaléine (R) et alcaliniser légèrement avec une solution saturée de borax (R) ; laisser 5 minutes en contact. Ajouter 2 gouttes d'une solution de sulfate de fer(□□□) et d'ammonium à 10 p. 100 (R) et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) ; il ne doit se produire ni coloration, ni précipité bleu.

3.6 Hydrocarbures aromatiques supérieurs

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dont le benzo□a□pyrène sont extraits par l'hexane; le solvant est évaporé et le résidu est repris par le mélange méthanol-tétrahydrofuranne pour analyse en CLHP suivant la méthode décrite au chapitre II.

REMARQUE : Il est également possible de doser le benzo[a]pyrène par chromatographie en phase gazeuse en utilisant une colonne capillaire apolaire avec détection par spectrométrie de masse suivant la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international.

La teneur en benzo□a□pyrène ne doit pas excéder 10 µg/kg.

3.7 Sulfures

Placer dans un ballon de 50 ml une quantité de charbon contenant 1 g de charbon sec avec 10 ml d'acide chlorhydrique dilué (R) et 10 ml d'eau.

Distiller en recueillant 5 ml de distillat dans un tube à essai contenant 5 ml de solution 1 M d'hydroxyde de sodium.

1 ml de solution d'essai est additionné de 0,5 ml d'une solution de nitrate de plomb à 1 g par litre (R). On ne doit pas observer de coloration brune ou de précipité noir.

La teneur en sulfures exprimée en soufre ne doit pas être supérieure à 20 mg/kg.

3.8 Préparation de la solution pour essais

Dans un flacon conique à large col pouvant être hermétiquement bouché, placer une quantité de charbon correspondant à 2,5 g de charbon sec avec 50 ml de solution d'acide citrique à 5 g par litre amené à pH 3 (R). Agiter énergiquement pendant 5 minutes et laisser reposer au moins 12 heures. Filtrer sur filtre serré ou sur membrane afin d'obtenir une solution limpide.

3.9 Fer

A 5 ml de la solution pour essais préparée selon l'alinéa 3.8, ajouter

5 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), 2 ml d'une solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration obtenue doit être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 10 ml d'une solution de sel de fer(□□I) à 0,010 g de fer par litre (R), 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). On peut également utiliser la spectrophotométrie d'absorption atomique.

La teneur en fer ne doit pas être supérieure à 200 mg/kg.

3.10 Plomb

Sur la solution pour essais préparée selon l'alinéa 3.8, doser le plomb selon la méthode décrite au chapitre II.

La teneur en plomb ne doit pas être supérieure à 2 mg/kg.

3.11 Mercure

Sur la solution pour essais préparée selon l'alinéa 3.8, doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II. La teneur en mercure ne doit pas être supérieure à 1 mg/kg.

3.12 Arsenic

Sur la solution pour essais préparée selon l'alinéa 3.8, rechercher l'arsenic par la méthode décrite au chapitre II. La teneur en arsenic ne doit pas être supérieure à 3 mg/kg.

3.13 Calcium

Sur la solution pour essais préparée selon l'alinéa 3.8, doser le calcium selon la méthode décrite au chapitre II. La teneur en calcium ne doit pas être supérieure à 10 g/kg.

3.14 Cadmium

Sur la solution pour essais préparée selon l'alinéa 3.8, doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II. La teneur en cadmium ne doit pas être supérieure à 1 mg/kg.

3.15 Zinc

Sur la solution pour essais préparée selon l'alinéa 3.8, doser le zinc selon la méthode décrite au chapitre II. La teneur en zinc ne doit pas être supérieure à 25 mg/kg.

3.16 Surface spécifique

La surface spécifique d'un charbon décolorant doit être comprise entre 600 et 2000 m2/g**.**

La méthode utilisée est celle de la décoloration du bleu de méthylène (Indice de bleu de méthylène).

3.17 Indice de Bleu de Méthylène

Préparer 4 fioles coniques et y introduire 0,1 g de charbon. Ajouter 10, 15, 17 et 20 ml de solution de bleu de méthylène à 1,2 g/l (absorbance à 620 nm comprise entre 0,830-0,850).

Après agitation pendant 5 mn, filtrer sur filtre lent et relever le volume de solution de la fiole conique ayant subi une décoloration. En fonction des résultats, renouveler l'expérience avec des volumes de solution différents.

Passer la solution au spectrophotomètre à 664 nm, la valeur de l'absorbance est de l'ordre de 0,08 pour un parcours optique de 1 cm

Le volume de la solution test de bleu de méthylène, en ml, juste décoloré représente l'Indice de bleu de méthylène.

4 INDICE DE PHENOL

4.1. INTRODUCTION

Dans le cas de charbons actifs appliqués dans le traitement du vin, l'indice de phénol permet de définir une valeur limite au delà de laquelle un charbon est considéré comme décolorant et au dessous de laquelle il est considéré comme désodorisant

L'indice de phénol retenu est l'indice AWWA B600-90

4.2 PRINCIPE :

Indice Phénol AWWA : cet indice, exprimé en g de charbon ramené au poids sec par l de solution représente la concentration de charbon en poudre nécessaire pour diminuer la concentration en phénol d'une solution de 200 mg/l à 20 mg/l.

4.3 DESCRIPTION DE LA METHODE AWWA :

Cet indice est déterminé à partir d'une isotherme d'adsorption établie à partir d'au moins 4 poids différents de charbon mis en contact avec une solution de phénol.

Cette isotherme représente le poids de phénol adsorbé en mg/l /g charbon, en fonction de la concentration en phénol résiduel dans la solution, exprimée mg/l.

4.4 REACTIFS

4.4.1 hydrogénophosphate disodique Na_2HPO_4 pur pour analyse

4.4.2 Eau distillée

4.4.3 Acide phosphorique (H_3PO_4) pur

4.4.4 Phénol pur

4.4.5 Solution tampon A d'hydrogénophosphate disodique à pH 6,5 à 104 g/l

Dans une fiole jaugée de 1 l, dissoudre 104 g d'hydrogénophosphate disodique (4.4.1) dans 300 ml d'eau (4.4.2) chaude, ajouter 14 ml Acide phosphorique (4.4.3) compléter à un litre. Homogéniser. Vérifier que le pH est à 6,5 ±0,1

4.4.6 Solution tampon B d'hydrogénophosphate disodique à pH 6,5 à 10,4 g/l

Dans une fiole jaugée de 1 l placer 100 ml de la Solution tampon A à 104 g/l (4.4.5) et compléter avec de l'eau (4.4.2). Homogéniser.

4.4.7 Solution de phénol à 1 g/l

Dans une fiole jaugée de 100 ml placer 100 mg de phénol (4.4.4) et compléter à 100 ml avec de l'eau (4.4.2). Obtenir la dissolution complète par agitation.

4.4.8 Solutions d'étalonnage de phénol à 20, 40, 60, 80, 100, et 120 mg/l

Dans une série de fiole jaugées de 100 ml placer respectivement 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, et 12 ml de la solution de phénol à 1 g/l (4.4.7). Compléter à 100 ml à l'aide de la solution tampon B (4.4.6).

4.4.9 Solutions de phénol à 200 mg/l

Dans une fiole de 1 l placer 200 ml de la solution de phénol à 1 g/l (4.4.7), ajouter 100 ml de la solution tampon A (4.4.5), compléter à 1 l avec de l'eau (4.4.2). Homogéniser.

4.4.10 Charbon œnologique en poudre dont on veut mesurer l'indice de phénol

Remarque Il faudra connaître le taux d'humidité de ce charbon pour ramener l'indice au poids sec de charbon.

4.5 APPAREILLAGE

4.5.1 Verrerie de laboratoire à savoir : pipettes jaugées de précision pour mesure de petits volumes, fioles jaugées de 100 ml et de 1 l, entonnoirs, flacons coniques de 300 ml…

4.5.2 Papier filtre

4.5.3 Balance de laboratoire au dixième de mg

4.5.4 Spectromètre pouvant fonctionner dans l'ultra violet et pouvant recevoir des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

4.5.5 Agitateur secoueur de laboratoire (il est déconseillé d'utiliser un barreau magnétique)

4.6 MODE OPERATOIRE

4.6.1 Courbe d'étalonnage du phénol.

Mesurer l'absorbance à 270 nm dans des cuves de 1 cm de trajet optique (4.5.4) de chacune des solutions de phénol à 20, 40, 60, 80, 100, et 120 mg/l (4.4.8). Calculer la droite de régression de l'absorbance en fonction de la concentration en phénol.

Remarque : le blanc est établi à partir de la solution tampon B (4.4.6).

4.6.2 Déterminer le phénol résiduel pour chaque charbon (4.4.10)

Dans une série de flacons coniques de 300 ml, placer 200 ml de solution de phénol à 200 mg/L (4.4.9), puis respectivement 0,4, 0,5, 0,6 et 0,7 g de charbon ; fermer le flacon.

Pour ces 4 préparations, mettre en agitation pendant 30 minutes (4.5.5) pour que le charbon reste en suspension.

Filtrer sur papier (4.5.2) les 4 échantillons contenant les charbons et un blanc (solution de phénol à 200 mg/l (4.4.8) sans charbon).

Mesurer l'absorbance à 270 nm dans des cuves de 1 cm de trajet optique (4.5.4) de chacune des solutions filtrées.

Remarque 1 le blanc est établi à partir de la solution tampon B (4.4.6).

Remarque 2 Au moins une des quantités de charbon doit adsorber 90 % du phénol de la solution, sinon élargir la gamme des poids de charbon.

4.7 CALCULS

4.7.1 Déterminer le pourcentage de phénol résiduel dans chaque filtrat pour chaque charbon actif : % résiduel = milligramme par litre de filtrat de phénol résiduel * 100/200 (milligramme par phénol de litre dans la solution d'essai). Soit a

4.7.2

Déterminer le pourcentage de X (phénol adsorbé)

% de X = 100 - % résiduel dans le filtrat. Soit X = 100 – a

Les quantités de charbon actif pour 200 ml de solution de phénol sont multipliées par 5 pour obtenir les quantités de charbon actif, soit M en grammes par litre.

4.7.3

Calculer le pourcentage de la valeur de X/M pour chaque charbon actif.

4.7.4

Tracer l'isotherme : le pourcentage de la normalité résiduelle de filtrat est porté en abscisse (a) et le pourcentage de X/M en ordonnée en utilisant le papier logarithmique 2 x 2 et établir la droite de régression et déterminer l'équation de la régression. Il est également possible de calculer la régression à partir du logarithme des valeurs de a et de X/M.

4.7.5

Déterminer X/M à 10 % ; soit c (lorsque la concentration résiduelle en phénol de filtrat est de 10 %).

4.7.6

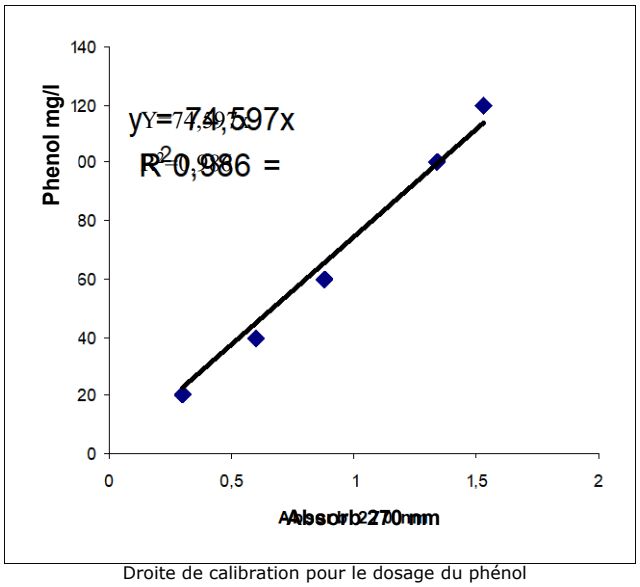
Indice de phénol en grammes par litre = 90 / c * (100 - % d'humidité /100) ; soit P

Cette formule se réfère à du charbon actif sans humidité.

4.7.7 Valeurs limites

Un charbon est considéré comme désodorisant si son indice de phénol est inférieur à 3,5

4.7.8

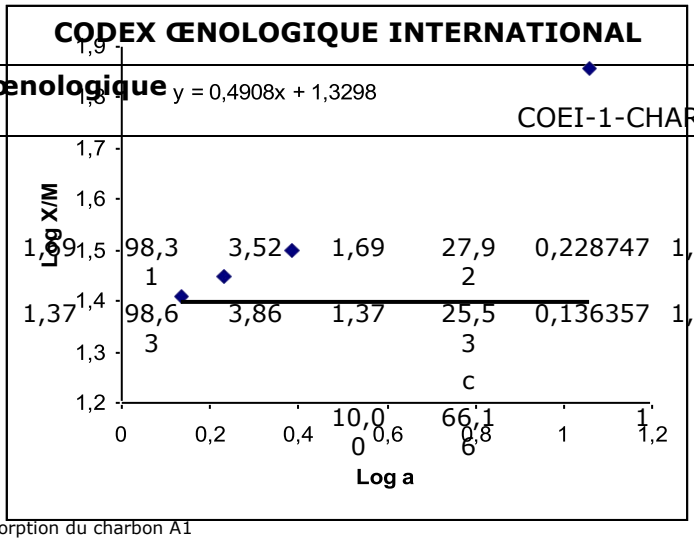


Droite de calibration pour le dosage du phénol

A1	g de charbon	% Humidité	Masse sèche	Abs	C phénol
	0,25	1,31	0,2467	0,309	23
	0,6255	1,31	0,6173	0,065	5
	0,7136	1,31	0,7043	0,0454	3
	0,7829	1,31	0,7726	0,0367	3

A1 Calculs

a	X	M	a	X/M	Log a	Log X/M
11,53	88,47	1,23	11,53	71,72	1,061829	1,855636
2,42	97,58	3,09	2,42	31,61	0,384605	1,499871



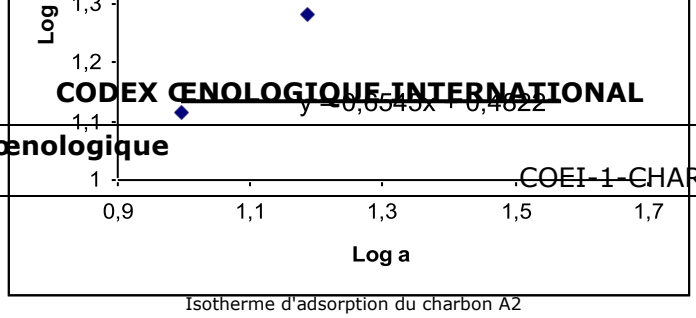
1,69	98,31	3,52	1,69	27,92	0,228747	1,445885
1,37	98,63	3,86	1,37	25,53	0,136357	1,407065
			c			P
			10,00	66,16	1	1,8206 1,3

Isotherme d'adsorption du charbon A1

A2	g de charbon	% Humidité	Masse sèche	Abs	C phénol
	0,4054	1,60	0,3989	0,9969	74
	0,6012				
	0,7914	1,60	0,5916	0,679	51
	0,9032	1,60	0,7787	0,4972	37
	1,4040	1,60	0,8887	0,4126	31
		1,60	1,3815	0,2654	20

A2 Calculs

a	X	M	a	X/M	Log a	Log X/M
37,18	62,82	1,99	37,18	31,49	1,570343	1,498241
25,33	74,67	2,96	25,33	25,25	1,403561	1,402199
18,54	81,46	3,89	18,54	20,92	1,268222	1,320569
15,39	84,61	4,44	15,39	19,04	1,187221	1,279687
9,90	90,10	6,91	9,90	13,04	0,995635	1,115409
				c		P
			10	13,70	1	1,1367 6,5



Isotherme d'adsorption du charbon A2

4.7.9 Analyse collaborative : Indices de phénol AWWA en g/l

	Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo4
A1	1,7	1,53	1,8	1,3
A2	5,1	4,56	6,2	6,5
A3	1,3	1,29	1,8	1,4
A4	5,8	4,95	10,0	7
B1	11,4	7,18	10,6	7,6
B2	1,8	1,47	2,3	1,4
B3	49,4	21,97	18,0	17,5
B4	2,9	2,80	3,6	2,6
C1	1,9	1,69	2,3	1,8
C2	1,7	1,56	2,0	1,5
C3	5,4	4,71	6,2	4,9
C4	5,4	4,55	6,0	4,7

Reproductibilité : 2,88 pour la moyenne générale 5,86 SR=1,03

5. DÉTERMINATION DU POUVOIR DÉCOLORANT DES CHARBONS

5.1 Principe

Mesure de la décoloration, dans des conditions définies, d'une solution d'oenocyanine par une quantité précise de charbon.

5.2 Appareillage :

Matériels :

5.2.1 Balance de précision au mg

5.2.2 Agitateur magnétique

5.2.3 Spectrophotomètre d'absorption pour mesures de DO à 420, 520 et 620 nm

Verrerie :

5.2.4 Vase cylindrique de 250 ml

5.2.5 Flacon conique de 250 ml

5.2.6 Fioles jaugées de 200 ml.

5.2.7 Cuve de 1 mm de parcours optique pour spectrophotomètre d'absorption

5.3 Réactifs

5.3.1 Eau déminéralisée ultra pure

5.3.2 Acide acétique cristallisable

5.3.3 Acide tartrique

5.3.4 Acétate de sodium cristallisé

5.3.5 Ethanol à 96 % vol

5.3.6 Oenocyanine poudre

5.4 Préparation de la solution d'oenocyanine

5.4.1 Verser environ 150 ml d'eau déminéralisée (5.3.1) dans un vase cylindrique de 250 ml (5.2.4)

5.4.2 Mettre sous agitation (5.2.2)

5.4.3 Peser 0,900 g ± 0,001 g d'oenocyanine (5.3.6) et verser en pluie dans

le tourbillon

5.4.4 Peser 1,400 g ± 0,01 g d'acide tartrique (5.3.3) et verser également

dans le vase cylindrique (5.2.4)

5.4.5 Verser 0,8 ml d'acide acétique cristallisable (5.3.2) et 1,4 g d'acétate de sodium cristallisé (5.3.4)

5.4.6 Laisser agiter jusqu'à complète dissolution (5.2.2)

5.4.7 Transvaser dans une fiole de 200 ml (5.2.6)

utiliser)

5.4.8 Ajuster à 200 ml avec l'eau de rinçage du vase cylindrique de la

préparation 5.4

5.4.9 Transvaser à nouveau dans le vase cylindrique de 250 ml (5.2.4)

5.4.10 Agiter (5.2.2)

5.4.11 Centrifuger 150 ml de solution pendant 10 mn à 10 000 g placer le

surnageant dans une cuve de 1 mm de parcours optique

5.4.12 Mesurer l'intensité colorante au spectrophotomètre (5.2.3) ICM1 = DO 420 + DO 520 + DO 620

ICM1= 4 ± 0,3

5.5 Décoloration par le charbon

5.5.1 Peser 100 mg de charbon sec

(mesurer l'humidité pour définir la dose exacte de charbon humide à

5.5.2 Verser le charbon dans 100 ml de solution d'oenocyanine d'intensité colorante

ICM 1 = 4 ± 0,3 (5.4)

5.5.3 Mettre sous agitation pendant 30 mn (5.2.2)

5.5.4 Laisser reposer 10 min puis centrifuger 10 ml du mélange pendant 10 mn à 10 000 g

5.5.5 Mesurer l'intensité colorante au spectrophotomètre (5.2.3) dans une

cuve de 1 mm de parcours optique ICM 2 = DO 420 + DO 520 + DO 620

5.6 Calcul du pouvoir décolorant

Le pouvoir décolorant: Pdec = 100 (ICM1 - ICM2) / ICM1

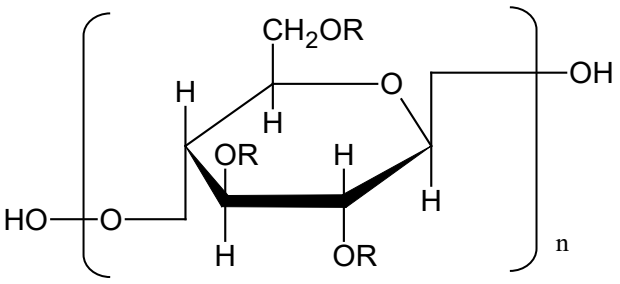
Un charbon est considéré comme "décolorant" lorsque Pdec est supérieur ou égal à 40.

6. CONSERVATION

En raison de ses capacités d'adsorption, le charbon ne peut pas être stocké dans des sachets ouverts.

Le charbon œnologique doit être conservé dans des emballages étanches à l'abri de substances volatiles qu'il peut adsorber.

CARBOXYMETHYLCELLULOSE
(Gomme de cellulose)
(CMC)
N° SIN 466
CAS [9004-32-4]
(OIV-Oeno 366-2009)



où R = H ou CH_2COONa

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La carboxyméthylcellulose à usage œnologique est préparée uniquement à partir de bois par traitement avec de la soude et de l'acide monochloroacétique ou son sel de sodium.
La carboxyméthylcellulose inhibe la précipitation tartrique par effet "colloïde protecteur". Sa dose d'utilisation est limitée.

2. SYNONYMES

Carboxyméthylcellulose
CMC
CMC sodique
Gomme cellulosique.
Sel de sodium de la carboxyméthyl éther de cellulose
NaCMC

3. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit mentionner que la carboxyméthylcellulose est à usage alimentaire, les conditions de sécurité et de conservation.

4. CARACTERES

4.1 Description

Poudre granuleuse ou fibreuse, blanche ou légèrement jaunâtre ou grisâtre, légèrement hygroscopique, inodore et insipide.
Elle peut être proposée sous forme de solution à diluer dans du vin avant utilisation. Les solutions doivent contenir au moins 3,5% de carboxyméthylcellulose.

4.2 Formule chimique

Les polymères contiennent des unités d'anhydroglucoses substitués avec la formule générale suivante :
$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_2COONa)_y]_n$ où
n est le degré de polymérisation
x = de 1,50 à 2,80
y = de 0,2 à 1,50
x + y = 3,0
(y = degré de substitution)
Note : Seules les carboxyméthylcelluloses dont le degré de substitution est compris entre 0,6 et 1,0 sont complètement solubles.

4.3 Degré de substitution

Evaluer le degré de substitution avec la méthode décrite ci-dessous.
Le degré de substitution doit être compris entre 0,60 et 0,95.

4.4 Poids moléculaire

Compris entre 17 000 et 300 000 (degré de polymérisation allant de 80 à 1 500)
Le poids moléculaire peut être évalué par la mesure de la viscosité.
La viscosité d'une solution à 1% doit être comprise entre 10 et 15 $mPa.s^{-1}$, ou entre 20 et 45 $mPa.s^{-1}$ pour une solution à 2%, ou entre 200 et 500 $mPa.s^{-1}$ pour une solution à 4%.

4.5 Composition

Mesurer la composition en carboxyméthylméthylcellulose selon la méthode décrite ci-dessous.

La teneur en carboxyméthylcellulose doit au moins être de 99,5 % de la substance anhydre.

5. ESSAIS

5.1 Solubilité

Produit une solution colloïdale visqueuse avec de l'eau.
Insoluble dans l'éthanol.

5.2 Test de la mousse

Une solution à 0,1 % de l'échantillon est secouée vigoureusement.
Aucune couche de mousse n'apparaît (ce test permet de distinguer la carboxyméthylcellulose sodique des autres éthers de cellulose et des produits des alginates et les gommes naturelles).

5.3 Formation d'un précipité

À 5 mL d'une solution à 0,5 % de l'échantillon ajouter 5 mL d'une solution à 5 % de sulfate de cuivre ou de sulfate d'aluminium. Un précipité apparaît (ce test permet de distinguer la carboxyméthylcellulose sodique des autres éthers de cellulose ainsi que de la gélatine, de la farine de graines de caroube et de la gomme adragante).

5.4 Réaction colorée

Ajouter 0,5 g de carboxyméthylcellulose sodique en poudre à 50 mL d'eau en remuant pour provoquer une dispersion uniforme. Continuer à remuer jusqu'à obtention d'une solution claire, puis l'utiliser pour effectuer le test suivant : à 1 mg d'échantillon dilué dans un même volume d'eau dans un petit tube à essais ajouter 5 gouttes d'une solution de 1-naphtol. Incliner le tube à essais et introduire prudemment le long du tube 2 mL d'acide sulfurique de manière à ce qu'il forme une couche inférieure. Une couleur rouge pourpre apparaît à l'interface.

5.5 Humidité - Perte par séchage

Mesurer la perte par séchage selon la méthode décrite ci-dessous.
La perte par séchage doit être inférieure à 12%.

5.6 pH d'une solution à 1 %

Pas moins de 6 et pas plus de 8,5 unités pH.

5.7 Arsenic

Doser l'arsenic selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg

5.8 Plomb

Doser le plomb selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg

5.9 Mercure

Doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg

5.10 Cadmium

Doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg

5.11 Glycolate libre

Doser le glycolate selon la méthode décrite ci-dessous.
La carboxyméthylcellulose ne doit pas contenir plus de 0,4 % (calculé en glycolate de sodium sur la substance anhydre).

5.12 Sodium

Doser le sodium selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en sodium doit être inférieure à 12,4 % de la substance anhydre

5.13 Chlorure de sodium

Doser le chlorure de sodium selon la méthode décrite ci-dessous.
La carboxyméthylcellulose ne doit pas contenir plus de 0,5 % de la substance anhydre.

Annexes

1. Perte par séchage

1.1 Objectif

Ce test détermine la partie volatile de la carboxyméthylcellulose.
Le résultat de cet essai est utilisé pour calculer les solides totaux de l'échantillon et par extension, toutes les substances volatiles à la température de l'essai sont considérées comme humidité.

1.2 Intérêt et utilisation

La mesure du taux d'humidité (en tenant compte de la pureté) est utilisée pour mesurer la quantité de carboxymethylcellulose dans les produits mis à la vente.

1.3 Matériel

1.3.1 Etuve à 105°C ± 3°C ;

1.3.2 Pèse- fitre de 50 mm de diamètre interne et 30 mm de haut ou équivalent ;

1.3.2 Balance de précision

1.4 Essai

1.4.1 Peser entre 3 et 5 g d'échantillon à ± 1 mg, dans un pèse-filtre préalablement taré.

1.4.2 Placer le pèse-filtre sans son couvercle dans l'étuve pendant quatre heures. Laisser refroidir dans un dessiccateur, replacer le couvercle et peser.

1.4.3 Continuer le processus jusqu'à poids constant.

1.5 Calcul

1.5.1 Calculer le pourcentage du taux d'humidité M selon la formule :

$$M = (A/B) \times 100$$

où

A = perte de poids par séchage (en g) ;

B = masse initiale d'échantillon.

2. Glycolate de sodium

2.1 Objectif

Ce test permet la quantification du glycolate de sodium contenu dans la carboxyméthylcellose purifiée contenant pas plus de 2% de glycolate de sodium.

2.2 Résumé de la méthode d'essai

La carboxyméthyl cellulose est dissoute dans de l'acide acétique (50%), précipitée avec de l'acétone en présence de chlorure de sodium et l'insoluble éliminé par filtration. Le filtrat contenant le glycolate de sodium (sous forme d'acide glycolique) est traité pour éliminer l'acétone et réagit avec le 2,7-dihydroxynaphtalène. La couleur résultante est mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre calibré à l'aide de solutions de concentrations connues.

2.3 Intérêt et utilisation

Cette méthode d'essai (avec celles concernant l'humidité et le chlorure de sodium) est utilisée pour mesurer la quantité de polymère dans la substance. Elle doit être utilisée pour la vérification de la pureté des carboxyméthylcelluloses imposée par les réglementations des autorités sanitaires.

2.4 Matériel

2.4.1 Spectrophotomètre utilisable pour réaliser une analyse à 540 nm ;
2.4.2 Cellules pour spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique
2.4.3 Papier d'aluminium en carrés d'environ 50 × 50 mm ;
2.4.4 Balance de précision

2.5 Réactifs

2.5.1 Acide acétique, glacial (pureté ≥ 99%) ;
2.5.2 Acétone (pureté ≥ 99%) ;
2.5.3 Solution de 2,7-dihydroxynaphtalène (0,100 g/L) : dissoudre 100 mg ± 1 mg de 2,7-dihydroxynaphtalène (naphtalenediol) dans 1L d'acide sulfurique. Avant utilisation, laisser reposer la solution jusqu'à disparition de la coloration initiale jaune. Si la solution est sombre,

l'éliminer et en préparer une nouvelle avec un lot différent d'acide sulfurique. Cette solution est stable un mois quand elle est stockées dans un flacon en verre brun ;

2.5.4 Solution étalon d'acide glycolique à 1 mg/mL : faire sécher plusieurs grammes d'acide glycolique dans un dessiccateur au moins seize heures à température ambiante. Peser 100 mg ± 1 mg, verser dans une fiole jaugée de 100 mL, dissoudre avec de l'eau, ajuster au trait de jauge avec de l'eau. Ne pas conserver la solution plus de 30 jours ;

2.5.5 Chlorure de sodium (NaCl, pureté $\geq$ 99%) ;

2.5.6 Acide sulfurique concentré (H_2SO_4 pureté $\geq$ 98%, $\rho \geq 1{,}84$).

2.6 Préparation de la droite d'étalonnage

2.6.1 Dans une série de cinq fioles jaugées de 100 mL, verser 0, 1, 2, 3 et 4 mL de la solution de référence d'acide glycolique (à 1 mg/mL). Dans chaque ballon, ajouter 5 mL d'eau, puis 5 mL d'acide acétique glacial, compléter au trait de jauge avec de l'acétone et mélanger. Ces fioles contiennent respectivement, 0, 1, 2, 3 et 4 mg d'acide glycolique.

2.6.2 Pipeter 2 mL de chaque solution et les transférer dans cinq fioles jaugées de 25 mL. Evaporer l'acétone en chauffant les fioles non fermées, disposées verticalement dans un bain marie pendant exactement 20 min. Enlever du bain marie et laisser refroidir à température ambiante.

2.6.3 Ajouter 5 mL de solution de 2,7-dihydroxynaphtalène à 0,100 g/L, bien mélanger, puis de nouveau ajouter 15 mL de solution de 2,7-dihydroxynaphtalène supplémentaires et mélanger. Couvrir les fioles avec un petit morceau de feuille d'aluminium, placer les fioles bien droites dans le bain marie pendant 20 min. Enlever du bain marie, laisser refroidir à température ambiante et compléter au trait de jauge avec de l'acide sulfurique.

2.6.4 Mesurer l'absorbance à 540 nm de chaque échantillon contre le blanc en utilisant des cellules de 1 cm de trajet optique. Tracer la courbe d'absorbance en fonction de la quantité correspondante d'acide glycolique (en mg) de chaque fiole.

2.7 Méthode d'essai

2.7.1 Peser 0,500 g ± 0,001 g d'échantillon et le transférer dans un bécher de 100 mL. Imbiber entièrement l'échantillon avec 5 mL d'acide acétique, suivi de 5 mL d'eau, mélanger avec une baguette de verre jusqu'à ce que la dissolution soit complète (15 minutes environ sont généralement nécessaires). Ajouter, lentement, 50 mL d'acétone en remuant, puis environ 1 g de sulfate de sodium. Continuer de remuer pendant plusieurs minutes, afin de précipiter complètement la carboxyméthylcellulose.

2.7.2 Filtrer à l'aide filtre en papier, préalablement imbibé avec une petite quantité d'acétone et recueillir le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL. Utiliser 30 mL d'acétone pour faciliter le transfert de matières solides et pour laver le résidu de filtration. Compléter au trait de jauge avec de l'acétone et mélanger.

2.7.3 Dans un autre fiole jaugée de 100 mL, préparer un blanc avec 5 mL d'eau, 5 mL d'acide acétique glacial, puis compléter au trait de jauge avec de l'acétone et mélanger.

2.7.4 Pipeter 2 mL de la solution d'échantillon et 2 mL de la solution de blanc et les verser dans deux fioles jaugées de 25 mL. Evaporer l'acétone comme précédemment (2.6.2).

2.7.5 Mesurer l'absorbance de l'échantillon et extrapoler la quantité d'acide glycolique (en mg) à l'aide de la courbe de calibration (2.6.4).

2.8 Calcul : calculer la teneur C (en %) de glycolate de sodium (glycolate libre) contenu selon la formule :

$$C(\%\ \ sodium\ \ glycolate) \ = \ \frac{B \times 0.129}{W \times (100 - M)}$$

où
B = acide glycolique (en mg) extrapolé de la courbe de calibration ;
W = quantité de carboxyméthylcellulose pesée (en g) ;
M = taux d'humidité de l'échantillon (en %) ;
0,129 = (rapport du poids moléculaire du glycolate de sodium par rapport au poids moléculaire de l'acide glycolique) / 10.

Note : si l'essai est fait avec une carboxyméthylcellulose préalablement déshydratée, la formule devient :

$$C(\%\ \ sodium\ \ glycolate) \ = \ \frac{B \times 0.129}{W}$$

W = quantité de carboxyméthylcellulose (sèche) pesée (en g).

3 Chlorure de sodium

3.1 Objectif

Cette méthode d'essai concerne la détermination de la teneur en chlorure de sodium de la carboxymethylcellulose purifiée (> 98%).

3.2 Résumé de la méthode d'essai

La carboxyméthylcellulose de sodium est dissoute dans l'eau et titrée par potentiométrie avec une solution de nitrate d'argent. Le peroxyde d'hydrogène est ajouté pour réduire la viscosité de la solution.

3.3 Importance et utilisation

Cette méthode d'essai (avec l'humidité et de la teneur en glycolate de sodium) est utilisée pour calculer le degré de substitution de la carboxyméthylcellulose. Il doit être utilisé pour analyser les qualités de carboxyméthylcellulose de sodium hautement purifiées (>98%).

3.4 Matériel

3.4.1 pH-mètre permettant de lire les voltages (en mV), équipé d'une électrode d'argent et d'une électrode de référence au sulfate de mercure I saturée au sulfate de potassium.

3.4.2 Burette de 10 ml.

3.4.3 Balance de précision.

3.4.4 Erlenmeyer de 250 mL.

3.5. Réactifs

3.5.1 Peroxyde d'hydrogène concentré (30% en m/m) (H_2O_2).

3.5.2 Acide nitrique concentré (HNO_3) (ρ 1,42).

3.5.3 Nitrate d'argent, solution étalon (0,1 N) - Dissoudre 17,0 g de nitrate d'argent ($AgNO_3$) dans 1 L d'eau. Conserver dans un flacon en verre ambré. Normaliser la solution comme suit : sécher

le chlorure de sodium (NaCl) pendant 2 h à 120°C. Peser 0,65 g ± 0.0001 g, dans un bécher de 250 ml et ajouter 100 ml d'eau. Placer sur un agitateur magnétique, ajouter 10 ml d'HNO_3, et plonger les électrodes du pH-mètre. A l'aide d'une burette, ajouter par fraction de 0,25 mL la quantité théorique de solution de $AgNO_3$. Après chaque addition, attendre environ 30 secondes avant d'effectuer la lectures des voltages correspondants. En approchant du point final, diminuer les ajouts à 0,05 mL. Enregistrer le voltage (en millivolts) en fonction du volume (en mL) de la solution de titrage, continuer le

titrage quelques mL au-delà du point final. Tracer les valeurs de potentiels obtenus, en fonction des volumes de solution titrée correspondants et déterminer le potentiel du point équivalent d'après le point singulier de la courbe obtenue. Calculer la normalité, N, comme suit :

$$N = (A \times 1000) / (B \times 58,45)$$

où
A = NaCl utilisé en g,
B = solution ajoutée de AgNO3 en mL,
$58,45$ = masse moléculaire du NaCl en g,

3.5.4 Chlorure de sodium (NaCl, pureté ≥ 99%).

3.6 Méthode d'essai

3.6.1 Peser 5 g ± 0.0001 g d'échantillon, dans un bécher de 250 mL. Ajouter 50 mL d'eau et 5 mL de H_2O_2 (30%). Placer le bécher au dessus d'un bain marie, en remuant de temps pour parvenir à une solution fluide. Si la dissolution n'est pas atteinte après 20 min, ajouter 5 mL d'H_2O_2 et chauffer jusqu'à ce que la dissolution soit complète.

3.6.2 Refroidir le bécher, ajouter 100 mL d'eau et 10 mL d'HNO_3. Placez-le sur l'agitateur magnétique et titrer avec la solution de $AgNO_3$ 0,1 N (3.5.3) jusqu'au point d'équivalence.

3.7 Calcul

3.7.1 Calculer la teneur en chlorure de sodium, C (en %), comme suit:

$$C = (AN \times 584,5) / [G \times (100 - B)]$$

où :
A = volume de solution de $AgNO_3$ solution ajoutée (en mL) ;
N = Normalité de la solution de $AgNO_3$;
G = poids d'échantillon utilisé (en g),
B = humidité, déterminée extemporanément (en %), conformément au paragraphe 5.14 et 584,5 = masse moléculaire de NaCl $\times$ 10 (en g).

4 Degré de substitution

4.1 Objectif

Cette méthode sert à déterminer le degré d'étherification (de substitution) des carboxyméthylcellulose utilisée.

4.2 Résumé de la méthode d'essai

La carboxyméthylcellulose préalablement purifiée est minéralisée en présence d'acide sulfurique. Le poids de sulfate de sodium résiduel permet de connaître la teneur en sodium et par là le degré de substitution.

4.3 Importance et utilisation

Cette méthode d'essai sert à déterminer le nombre de groupes substituants ajoutés au squelette de cellulose de base.

4.4 Matériel

4.4.1 Fiole conique de 500 mL.
4.4.2 Balance de précision.
4.4.3 Filtre en verre fritté.
4.4.4 Fiole à vide.
4.4.5 Creuset en porcelaine.
4.4.6 Etuve à 110°C.
4.4.7 Dessiccateur
4.4.8 Bec Bunsen ou four à moufle à 600°C.

4.5 Réactifs

4.5.1 Méthanol ou éthanol (pureté ≥ 98%)
4.5.2 Nitrate d'argent ($AgNO_3$) 0,1N
4.5.3 Acétone (pureté ≥ 99%)
4.5.4 Acide sulfurique (pureté ≥ 96%)
4.5.5 Carbonate d'ammonium (NH_4HCO_3)

4.6 Préparation de l'échantillon

(Cette étape n'est pas nécessaire s'il est avéré que l'échantillon contient au moins 99,5% de carboxyméthylcellulose) Peser 5 g de l'échantillon ± 0,1 mg, et le transférer dans une fiole conique de 500 mL. Ajouter 350 mL de méthanol ou d'éthanol (80% en volume). Agiter la suspension pendant 30 min. A l'aide d'une fiole à vide, filtrer sur verre fritté doux. A la fin de la filtration, éviter d'aspirer de l'air à travers le rétentat. Répétez le traitement jusqu'à ce que l'essai au nitrate d'argent 0,1 N pour les ions chlorures soit

négatif pour les filtrats. Normalement, trois lavages sont suffisants. Transférer la carboxyméthylcellulose dans le même creuset. Eliminer les traces d'alcool en rinçant avec de l'acétone. Laisser l'acétone s'évaporer à l'air (sous une hotte) puis dans une étuve à 110°C jusqu'à poids constant. Peser la première fois après deux heures. Refroidir le creuset à chaque fois dans un dessiccateur et faire attention lors de la pesée au fait que la carboxyméthylcellulose sodique est légèrement hygroscopique.

4.7 Méthode d'essai

Dans un creuset de porcelaine préalablement taré, peser 2 g ± 0,1 mg, de substance séchée selon la préparation ci-dessus. Carboniser au bec Bunsen, au départ, soigneusement avec une petite flamme et par la suite pendant 10 min, avec une grande flamme. Refroidir, puis verser 3 à 5 mL d'acide sulfurique concentré sur le résidu. Chauffer à la flamme jusqu'à ce que le dégagement de fumée soit terminé. Après refroidissement ajouter environ 1 g de carbonate d'ammonium en versant la poudre sur l'ensemble du contenu du creuset. Chauffer à nouveau, d'abord avec une petite flamme jusqu'à ce que le dégagement de fumée soit fini puis au rouge profond pendant 10 min. Répétez le traitement à l'acide sulfurique et au carbonate d'ammonium si le sulfate de sodium résiduel contient toujours du carbone. Laisser refroidir le creuset dans un dessiccateur et peser. Au lieu d'ajouter du carbonate d'ammonium et de chauffer à la flamme, le creuset peut être placé pendant une heure dans un four à environ 600°C.

4.8 Calculer la teneur en sodium de l'échantillon extrait à l'alcool par la formule :

$$\%\ sodium\ =\ \frac{a \times 32.38}{b}$$

a = poids du sulfate de sodium résiduel
b = poids de l'échantillon extrait à l'alcool sec

4.9 Calculer le degré de substitution par la formule:

$$Degré\ \ de\ \ substitution\ =\ \frac{162 \times \%\, sodium}{2300 - (80 \times \%sodium)}$$

5. Composition en carboxyméthylcellulose

Calculer le pourcentage de carboxyméthylcellulose de sodium dans l'échantillon en soustrayant de 100% la somme des pourcentages de

sodium et de chlorure de sodium glycolate (glycolate libre), déterminés séparément par les procédures ci-dessus.

Teneur en carboxyméthylcellulose (en%) = 100 – (% NaCl + % glycolate de sodium)

6 Mesure de la viscosité

6.1. Objectif

6.1.1 Il s'agit d'une méthode d'essai destinée à déterminer la viscosité de solutions aqueuses de carboxyméthylcellulose dans la limite de 10 à 10 000 mPa.s^{-1} à 25°C.

6.1.2 La concentration utilisée pour l'essai doit être telle que la détermination de la viscosité de la solution sera possible dans les limites du test.

6.1.3 Le résultats de la mesure de la viscosité de la carboxyméthylcellulose par la présente méthode d'essai n'est pas nécessairement identique aux résultats obtenus avec d'autres types d'instruments utilisés pour les mesures de viscosité.

6.1.4 Les déterminations sont calculés sur un poids sec, ce qui impose de connaître le taux d'humidité de la carboxyméthylcellulose (voir §5.14).

6.1.5 Les mobiles Brookfield (spindles) et les vitesses indiquées dans le tableau 1 sont recommandées, mais peuvent être adaptées pour plus de commodité.

TABLEAU 1 : Mobiles et vitesses requises par le viscosimètre

Domaine de viscosité, (en $mPa.s^{-1}$)	mobile n°	vitesse (en $tr.min^{-1}$)	Echelle	Facteur
10 to 100	1	60	100	1
100 to 200	1	30	100	2
200 to 1000	2	30	100	10
1000 to 4000	3	30	100	40

6.2. Intérêt et utilisation

Cette méthode d'essai permet d'estimer le poids moléculaire des carboxymethylcellulose

6.3. Matériel

6.3.1 Viscosimètre de type Brookfield.

6.3.2 Récipient en verre, d'environ 64 mm (2 ½ in) de diamètre et 152 mm (6 in) de haut, à bord droit, capacité de 340 g (12 oz).

6.3.3 Balance de précision

6.3.4 Agitateurs mécaniques avec une pale en acier inoxydable fixé à un moteur à vitesse variable capable de fonctionner à 900 ± 100 $tr.min^{-1}$ sous différentes conditions de charge.

6.3.5 Bain-marie, à 25°C ± 0,5°C.

6.3.6 Thermomètre de précision capable de lire des températures dans la gamme 20 à 30°C ± 0,1°C.

6.4. Méthode d'essai

6.4.1 Détermination de l'humidité selon le § 1.

6.4.2 Calculer le poids sec de l'échantillon, M, en grammes nécessaire pour préparer 240 g de la solution d'essai comme suit :

$$M = 100\,A / (100 - B)$$

où:

A = masse sèche souhaitée de l'échantillon en g, et

B = le taux d'humidité de l'échantillon en %.

6.4.3 Calculer la quantité d'eau distillée comme suit:

$$V = 240 - S$$

où:
V = volume d'eau distillée en mL et
S = masse de l'échantillon en g.

6.4.4 Ajouter la quantité d'eau calculée dans le récipient. La position de l'agitateur doit permettre un débattement minimal entre les pales et le fond du récipient.

6.4.5 Démarrer lentement l'agitation et ajouter la carboxyméthylcellulose. Ajustez la vitesse en remuant à environ 900 ± 100 $tr.min^{-1}$ et mélanger pendant 2 h. Ne pas laisser l'agitation dépasser 1200 $tr.min^{-1}$ car des vitesses plus élevées ont tendance à affecter la viscosité de certaines carboxyméthylcellulose.
REMARQUE: Si l'échantillon est ajouté trop rapidement, une agglomération va se produire. Qui pourrait empêcher la dissolution complète de l'échantillon dans le temps indiqué.

6.4.6 Arrêter l'agitation et transférer le récipient contenant l'échantillon dans le bain marie jusqu'à température constante (environ une heure). Vérifier la température de l'échantillon avec un thermomètre au bout d'une heure et veiller à ce que la température d'essai ait été atteinte.

6.4.7 Enlever le récipient contenant l'échantillon du bain marie et agiter vigoureusement pendant 10 s. Mesurer de la viscosité avec le viscosimètre Brookfield, en choisissant le mobile et la vitesse selon le tableau 1. Laisser le mobile tourner pendant trois minutes avant d'effectuer la lecture.

6.5. Calcul

6.5.1 Calculer la viscosité, V, en millipascals par seconde (mPa.s-1) comme suit:

$$V = lecture \times facteur$$

6.6. Expression du résultat

Exprimer le résultat de la viscosité Brookfield à 25°C, en indiquant la concentration de la solution le mobile et la vitesse de mobile utilisés.

CELLULOSE
$(C_{12}\ H_{20}\ O_{10})_n$
N° SIN : 460
(Oeno 8/2002)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La cellulose est obtenue par traitement mécanique et purification à partir de l'alpha-cellulose provenant directement de fibres végétales. Son poids moléculaire est d'environ $1,5 . 10^5$ Dalton.
La cellulose fibre est utilisée pour ses qualités adsorbantes, notamment pour la filtration des vins.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de conservation.

3. CARACTERES

La cellulose se présente sous forme de fibres de couleur blanche inodore et sans saveur. Elle est insoluble dans l'eau.

4. ESSAIS

4.1 pH

Agiter pendant 20 minutes environ 5 g de cellulose dans 40 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone. Centrifuger. Le pH du liquide surnageant doit être compris entre 5,0 et 7,5.

4.2 Humidité et matières volatiles

Placer 5 g de cellulose dans une étuve à 105°C pendant 3 heures.
La perte de poids ne doit pas dépasser 8 p. 100.

Toutes les limites fixées ci-après se rapportent au produit sec.

4.3 Amidon

A 10 g de cellulose microcristalline, ajouter 90 ml d'eau (R) et faire bouillir pendant 5 mn. Filtrer à chaud. Refroidir et ajouter au filtrat 0,1 ml de solution d'iode 0,05 M.
Il ne doit pas apparaître de coloration bleue.

4.4 Cendres
Incinérer à 600 °C ± 25°C le résidu obtenu selon le point 4.2, pendant 4 heures. Le poids de cendres ne doit pas être supérieur à 0,2 p. 100.

4.5 Préparation de la solution pour essais
Après pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau (R). Chauffer pour activer la dissolution et compléter à 50 ml avec de l'eau (R).

4.6 Fer
Sur la solution préparée pour essais (4.5), doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique, voir méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en fer doit être inférieure à 100 mg/kg.

4.7 Plomb
Sur la solution préparée pour essais (4.5), effectuer le dosage du plomb selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

4.8 Mercure
Effectuer le dosage du mercure à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg.

4.9 Cadmium
Sur la solution préparée pour essais (4.5) effectuer le dosage de Cadmium selon la méthode décrite au Chapitre II. La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

4.10 Arsenic
Sur la solution préparée pour essais (4.5) effectuer le dosage de l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 2 mg/kg.

4.11 Calcium
Sur la solution préparée pour essais (4.5) effectuer le dosage du calcium par spectrophotométrie d'absorption atomique, voir méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en calcium doit être inférieure à 500 mg/kg.

4.12 Substances solubles dans l'eau

Evaporer à l'étuve à 105°C pendant 3 heures une partie aliquote du liquide surnageant obtenu lors de la détermination du pH au point 4.1. La teneur en substances solubles dans l'eau ne doit pas dépasser 0,25%.

5. CONSERVATION

La cellulose doit être conservée dans des lieux ventilés dans des emballages étanches à l'abri de substances volatiles qu'elle peut adsorber.

CELLULOSE EN POUDRE

$(C_{12}\ H_{20}\ O_{10})_n$

N° SIN : 460 (ii)

CAS: 9004-34-6

1. Objet, Origine et Domaine D'application

La cellulose en poudre est une cellulose de qualité alimentaire. C'est un homopolymère de glucose linéaire composé d'unités glucopyranose liées par des liaisons glycosidiques - β 1,4, son degré de polymérisation (DP) est dépendant de l'origine du matériau cellulolytique.

La cellulose en poudre est une cellulose purifiée et non modifiée, obtenue par la désintégration mécanique de l'alpha-cellulose, obtenue sous forme de pulpe à partir de matières végétales fibreuses.

La cellulose en poudre joue un rôle de "support" dans les milieux fermentaires clarifiés, elle permet un meilleur « dégazage » du dioxyde de carbone en début de fermentation alcoolique et raccourcit ainsi la phase de latence. Elle augmente la fermentescibilité des jus.

2. Etiquetage

Doivent être mentionnés sur l'étiquette

- L'identification de la cellulose et son usage alimentaire
- la concentration du produit, y compris en cas de mélange ;
- les conditions de sécurité et de conservation.
- le n° de lot
- la date de validité

3. Caractères

La cellulose en poudre se présente sous forme de paillettes ou de microfibres blanchâtres, inodores et sans saveur.

4. Limites et Méthodes d'essais

4.1 Identification

Sur un verre de montre, placer 10 mg environ de cellulose en poudre et disperser dans 2 ml de solution de chlorure de zinc iodé (R), la solution se colore en bleu-violet.

4.2 Solubilité

La cellulose en poudre est Insoluble dans l'eau, l'ethanol, l'ether et les acides minéraux dilués, Légèrement soluble dans une solution d'hydroxyde de sodium ».et légèrement soluble dans une solution d'hydroxyde de sodium.

4.3 Pureté

La teneur en cellulose en poudre ne doit pas être inférieure à 92%

4.4 Taille des particules fines

La taille des particules fines ne doit pas être inférieure à 5µm ; il ne doit pas y avoir plus de 10 % de particules de moins de 5 µm.

4.5 pH

Agiter pendant 60 minutes environ 10 g de cellulose sèche dans 90 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone. Centrifuger. Le pH du liquide surnageant doit être compris entre 5,0 et 7,5.

4.6 Substances solubles dans l'eau

Mélanger environ 6 g de l'échantillon, préalablement séché, avec 90 ml d'eau récemment bouillie et refroidie et laisser reposer pendant 10 min. Filtrer sur une membrane de porosité de 3 µm, jeter les 10 premiers mL de filtrat et passer le filtrat à travers le même filtre une deuxième fois si nécessaire pour obtenir un filtrat clair. Evaporer à sec une portion de 15 mL du filtrat dans une capsule d'évaporation tarée sur un bain de vapeur, sécher à 105 °C pendant 1 h. Peser la capsule contenant le résidu sec. Le résidu doit être inférieur à 15 mg.

4.7 Recherche d'Amidon

Ajouter 90 ml d'eau déminéralisée (R) à 10 g de cellulose en poudre et faire bouillir pendant 5 min. Filtrer à chaud avec filtre à membrane 25 µm. Refroidir et ajouter 0,1 ml de solution d'iode 0,05 M au filtrat. Aucune coloration bleue ne doit apparaître. Avec des grains très fins, une couleur bleu clair peut être observée après l'ajout d'une solution d'iode mais disparaîtra après 30 minutes.

4.8 Perte à la dessiccation

Placer 1 g de cellulose en poudre dans une capsule tarée pendant 3 heures à l'étuve à 100-105 °C. La perte à la dessiccation ne doit pas être supérieure à 7,0 %.

4.9 Cendres

Incinérer à 800 25 °C le résidu obtenu au point 4.8, pendant 4 heures. Le poids de cendres ne doit pas être supérieur à 0,3 %.

Toutes les limites fixées ci-après se rapportent au produit sec.

5. Préparation de la solution pour essais

Après pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau (R). Chauffer pour activer la dissolution et compléter à 50 ml avec de l'eau.

5.1 Fer

Sur la solution préparée pour essais (5), doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique, voir méthode décrite au Chapitre II. La teneur en fer doit être inférieure ou égale à 10 mg/kg.

5.2 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5), effectuer le dosage du plomb selon la méthode décrite au Chapitre II. La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

5.3 Mercure

Sur la solution préparée pour essai (5) Effectuer le dosage du mercure à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II. La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.4 Cadmium

Sur la solution préparée pour essais (5), effectuer le dosage du cadmium selon la méthode décrite au Chapitre II. La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.5 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5), Effectuer le dosage de l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II. La teneur en arsenic doit être inférieure à 1 mg/kg.

6. Conservation

La cellulose en poudre doit être conservée dans des lieux ventilés dans des emballages étanches à l'abri de substances volatiles qu'elle peut adsorber.

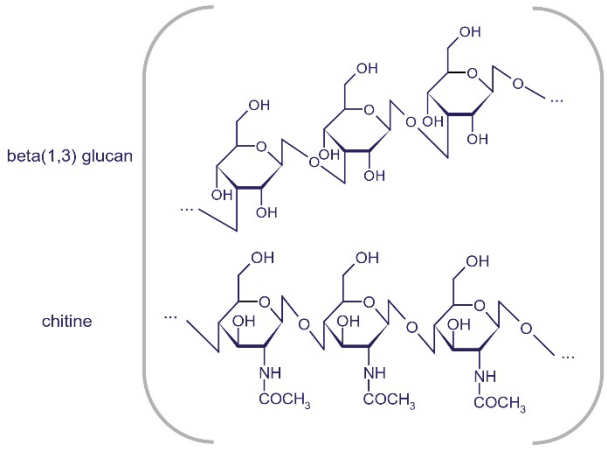
CHITINE-GLUCANE

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

Numéro CAS Chitine : **[1398-61-4]**

Numéro CAS β-glucan : **[9041-22-9]**

(OIV-Oeno 367-2009)



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 pharmaceutiques.

Le chitine glucan est constitué des polysaccharides chitine (unités de répétiton N-acetyl-D-glucosamine) et 1,3-β-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.

SYNONYMES

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

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.

CARACTERES

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.

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 %.

ESSAIS

Identification et rapport chitine-glucane

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.

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

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%.

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 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.

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.

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.

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.

Cadmium

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

Chrome

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

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.

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.

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.

CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE

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.
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.

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.

Salmonelles

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

Coliformes

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

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.

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.

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.

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 :

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.

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.
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.
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 1000ml

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 :

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

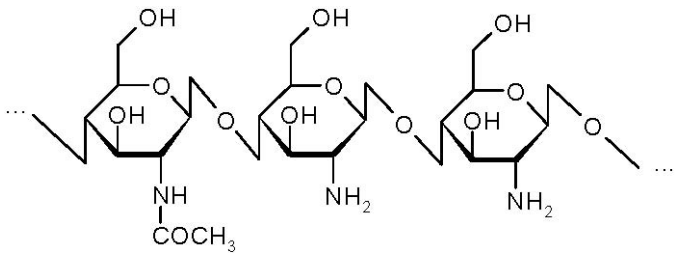
Composition :

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.

CHITOSANE
[C6H11NO4]n
Numéro CAS Chitosane: **[9012-76-4**]
(OIV-Oeno 368-2009, OIV-OENO 728-2025)



Chitosane

1 OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

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).

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 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.

La méthode décrite en annexe VIII et les limites fournies pour les différents rapports isotopiques peuvent être utilisées pour déterminer l'origine du chitosane (crustacés ou d'origine fongique).

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.

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

5.10 Zinc

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

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 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. REACTIFS ET MATERIELS

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 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 M_{cs})
= 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

$\mathbf{V_{NaOH}}$ = 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 $\mathbf{V_{NaOH}}$ 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

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)

<u>Bibliographie</u>
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 MATERIELS

2.1 Glucane de pureté 97%
2.2 Préparation commerciale de chitosane
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

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 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 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 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
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.

Annexe VIII

DÉTERMINATION DES RAPPORTS ISOTOPIQUES $^{13}C/^{12}C$ ET $^{15}N/^{14}N$ DU CHITOSANE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE DES RAPPORTS ISOTOPIQUES

INTRODUCTION

Le chitosane est un polysaccharide linéaire composé d'unités de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées en β(1-4) et qui présente de nombreuses applications commerciales. En œnologie, il est utilisé comme antioxydant, agent de collage, chélateur de métaux et pour le contrôle microbiologique, permettant de réduire l'utilisation de sulfites.

Le chitosane est produit par désacétylation de la chitine. Il peut être dérivé d'exosquelettes de crustacés ou de mycélium fongique. Seul le chitosane obtenu à partir de chitine fongique peut être utilisé en œnologie.

Les données présentées dans la littérature démontrent que les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ et $^{15}N/^{14}N$ du chitosane permettent de différencier les produits obtenus à partir d'exosquelettes de crustacés de ceux obtenus à partir de mycélium fongique.

La méthode ici décrite et les limites fournies pour les différents rapports isotopiques peuvent être utilisées pour déterminer l'origine du chitosane (crustacée ou fongique).

Avertissement : Certains réactifs utilisés au cours de ce mode opératoire sont dangereux : veillez à prendre des précautions particulières lors de leur utilisation. L'opérateur est prié de respecter les instructions indiquées sur l'étiquette du contenant du produit et de consulter les fiches de données de sécurité afin de prendre connaissance des informations spécifiques relatives à la dangerosité des réactifs utilisés et à la manière de les mettre au rebut.

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

L'objectif de la présente méthode est d'analyser les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ et $^{15}N/^{14}N$ du chitosane par des techniques de spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI).

2. TERMES ET DÉFINITIONS

Aux fins du présent document, les définitions suivantes s'appliquent :

- $^{13}C/^{12}C$: rapport des isotopes carbone 13 et carbone 12 pour un échantillon donné.
- $\delta^{13}C$: rapport entre les isotopes carbone 13 (^{13}C) et carbone 12 (^{12}C), exprimé en delta pour mille (‰).
- $^{15}N/^{14}N$: rapport des isotopes azote 15 et azote 14 pour un échantillon donné.
- $\delta^{15}N$: rapport entre les isotopes azote 15 et azote 14, exprimé en delta pour mille (‰).
- V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) : étalon de référence international pour le calcul de $\delta^{13}C$.
- V-AIR (air) : étalon de référence international pour le calcul de $\delta^{15}N$.

3. PRINCIPE

Analyse du chitosane. Les rapports isotopiques stables de C et de N sont analysés au moyen d'un spectromètre de masse des rapports isotopiques (SMRI) connecté à un analyseur élémentaire (AE) à partir des courants ioniques suivants :

- m/z = 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O$) et m/z = 45 ($^{13}C^{16}O^{16}O$) produits par le dioxyde de carbone issu de la combustion de l'échantillon au sein de l'analyseur élémentaire,
- m/z = 28 ($^{14}N_2$) et m/z = 29 ($^{15}N^{14}N$) produits par l'azote issu de la combustion de l'échantillon au sein de l'analyseur élémentaire.

4. RÉACTIFS ET MATÉRIAUX

Les réactifs et consommables dépendent de l'appareillage utilisé par le laboratoire. Des analyseurs élémentaires sont généralement utilisés pour la combustion des échantillons. Ces systèmes peuvent être équipés de systèmes automatiques pour l'introduction d'échantillons placés dans des capsules métalliques scellées. Le laboratoire peut utiliser n'importe quel matériau de référence international certifié en plus de ceux indiqués dans le tableau au point 4.3.

4.1. Consommables

4.1.1. Alcool éthylique absolu (n° CAS : 64-17-5).

4.1.2. Hélium pour l'analyse (n° CAS : 07440-59-7).

4.1.3. Oxygène pour l'analyse (n° CAS : 07782-44-7).

4.1.4. Réactifs d'oxydation et de réduction pour le four et le système de combustion, tels que l'oxyde de cuivre (II) pour l'analyse élémentaire (n° CAS 1317-38-0).

4.1.5. Agent dessiccateur pour éliminer l'eau produite par la combustion. Par exemple de l'anhydrone pour analyse élémentaire (perchlorate de magnésium) (n° CAS : 10034-81-8). Non nécessaire si le dispositif est doté d'un système d'élimination de l'eau par piégeage cryogénique ou au moyen d'un capillaire sélectivement perméable.

4.1.6. Capsules jetables en étain.

4.2. Étalons de travail

4.2.1. Dioxyde de carbone (CO_2) (n° CAS : 00124-38-9) d'une pureté non inférieure à 99,998 % et azote (N_2) d'une pureté non inférieure à 99,999 % comme gaz de référence pour la mesure.

4.2.2. Étalons de contrôle et de travail avec des valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ calibrées par rapport à des matériaux de référence internationaux.

4.3. Matériaux de référence les plus communément utilisés présentant des valeurs de $\delta^{13}C$ et de $\delta^{15}N$ certifiées

Nom	Matériau	$\delta^{13}C$ par rapport à V-PDB (‰)	$\delta^{15}N$ par rapport à AIR (‰)
USGS40	Acide glutamique	−26,39 ± 0,04	−4,52 ± 0,06
USGS42	Poudre de cheveux humains (Tibet)	−21,09 ± 0,10	+8,05 ± 0,10
USGS43	Poudre de cheveux humains (Inde)	−21,28 ± 0,10	+8,44 ± 0,10
USGS54	Poudre de bois de pin tordu canadien	−24,43 ± 0,02	−2,42 ± 0,32
USGS55	Poudre de bois de ziricote mexicain	−27,13 ± 0,02	−0,3 ± 0,4
USGS56	Poudre de bois d'ivoire rose d'Afrique du Sud	−24,34 ± 0,01	+1,8 ± 0,4
USGS90	Farine de millet provenant de Toscane (Italie)	−13,75 ± 0,06	+8,84 ± 0,17
IAEA-600	Caféine	−27,771 ± 0,043	+1,0 ± 0,2

5. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et en particulier :

5.1. Spectromètre de masse des rapports isotopiques (SMRI)

Le spectromètre de masse des rapports isotopiques permet de déterminer la teneur relative de l'isotope lourd par rapport à l'isotope léger du dioxyde de carbone et de l'azote résultant de la combustion de l'échantillon, avec une précision interne de 0,1 ‰ pour C et de 0,2 ‰ pour N. On entend par précision interne, la différence entre deux mesures d'un même échantillon de gaz.

Le spectromètre de masse utilisé est généralement équipé d'une série de collecteurs pour mesurer simultanément les courants ioniques m/z = 44, 45, 46 ou m/z = 28, 29, 30.

En mesurant les intensités correspondantes, le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ par exemple est déterminé par les rapports d'intensité de m/z = 45 et m/z = 44 après les corrections relatives à l'espèce isobare $^{12}C^{17}O^{16}O$, dont la contribution peut être calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour m/z = 46 et de l'abondance relative de ^{18}O et de ^{17}O (correction de Craig).

Pour la détermination du rapport isotopique, le spectromètre de masse doit comporter :

- Un système à double introduction (système à double entrée) pour mesurer en alternance l'échantillon et l'étalon de référence,
- Ou un système à flux continu qui transfère quantitativement les gaz résultant de la combustion des échantillons et des étalons de travail dans le spectromètre de masse.

5.2. Analyseur élémentaire (AE)

Équipement de combustion en mesure de convertir quantitativement l'échantillon en dioxyde de carbone (en cas de combustion) ainsi que de séparer les gaz et d'éliminer l'eau sans aucun fractionnement isotopique. Cet équipement peut être soit un système à flux continu intégré au spectromètre de masse, soit un système de combustion autonome. Dans le dernier cas, les gaz sont collectés dans des contenants spéciaux qui sont ensuite reliés au SMRI.

5.3. Microbalance analytique (intervalle min. : 0-100 mg et précision min. : 0,01 mg)

5.4. Centrifugeuse

5.5. Lyophilisateur ou système de dessiccation

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Préparation de l'échantillon pour l'analyse

Laver 10 g de chitosane trois fois avec une solution aqueuse d'éthanol de grande pureté à 10 % (v/v). Centrifuger et lyophiliser ensuite l'échantillon.

6.2. Analyse des rapports isotopiques

Pour la mesure instrumentale, on applique la procédure recommandée par les techniciens du fabricant dans le manuel de l'appareil.

La description qui suit se réfère au mode opératoire communément utilisé lors de la combustion ou de la pyrolyse d'échantillons au moyen de systèmes de combustion automatisés commerciaux. Il est possible d'utiliser d'autres méthodes qui assurent la conversion quantitative des échantillons en dioxyde de carbone et en azote sans pertes par évaporation.

6.2.1. Introduction des échantillons dans les capsules et analyse

- Utiliser des capsules, des pinces et un plateau de préparation propres.
- Utiliser des capsules en étain pour la combustion.
- Prendre une capsule de la bonne taille à l'aide de pinces.
- Introduire la quantité d'échantillon requise dans la capsule en utilisant une spatule adaptée.

  Remarque :
  Il est nécessaire d'établir la quantité adéquate d'échantillon à peser de sorte que la quantité de CO_2 produite par l'échantillon et celle de l'étalon de travail (ou du matériau de référence) ne diffèrent pas de plus 50 %. Pour se trouver dans cet intervalle d'acceptabilité, une mesure préalable révélant la quantité d'échantillon à peser doit être effectuée (si inconnue).
- Peser à l'aide d'une microbalance analytique.

- Refermer la capsule à l'aide des pinces.
- Préparer au moins deux capsules pour chaque échantillon.
- Disposer convenablement les capsules dans le tambour de l'échantillon de l'analyseur élémentaire (si disponible). Chaque capsule devrait être soigneusement identifiée par ordre numérique.
- Disposer systématiquement les capsules contenant les étalons de travail au début et à la fin de la série d'échantillons.
- Introduire régulièrement des échantillons de contrôle dans la série d'échantillons (ex. un chitosane du commerce préalablement calibré, voir point 4.2) afin d'établir une carte de contrôle.

6.2.2. Contrôle et réglage des instruments pour l'analyse isotopique

- Pour une combustion optimale de l'échantillon, régler la température des fours de l'analyseur élémentaire ainsi que les flux de dioxyde de carbone, d'hélium et d'oxygène gazeux, en suivant les instructions du fabricant.
- Vérifier l'absence de fuites dans le système assurant l'analyse élémentaire/la pyrolyse ainsi que la spectrométrie de masse (par exemple en vérifiant le courant ionique pour le rapport m/z = 40, qui correspond à l'argon).
- Régler le spectromètre de masse en suivant les instructions du fabricant.
- Avant de commencer à effectuer les mesures des échantillons, vérifier le système en utilisant des étalons de travail.

6.2.3. Réalisation des mesures

Les échantillons sont introduits successivement dans l'échantillonneur automatique de l'analyseur élémentaire. Les gaz issus de la combustion de chaque échantillon sont ensuite transférés au sein du spectromètre de masse, qui mesure les courants ioniques. L'ordinateur, relié à l'appareillage, enregistre l'intensité des courants ioniques et calcule les valeurs δ pour chaque échantillon.

7. CALCULS

7.1. Correction et expression des données isotopiques

Selon le protocole de l'IUPAC, les valeurs $^{13}C/^{12}C$ et $^{15}N/^{14}N$ sont exprimées en échelle delta (δ ‰) par rapport aux étalons internationaux V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) et AIR (air), selon l'équation 1 :

$$\delta_{\text{ref}}({}^{i}E/{}^{j}E, \text{sample}) = \left[\frac{R({}^{i}E/{}^{j}E,\text{sample})}{R({}^{i}E/{}^{j}E,\text{ref})}\right] - 1 \qquad (1)$$

où *ref* est l'étalon international de mesure, *sample* l'échantillon analysé et ${}^{i}E/{}^{j}E$ le rapport isotopique entre les isotopes plus lourds et les plus légers. Les valeurs delta sont multipliées par 1000 et exprimées en unités « pour mille » (‰).

Les données sont généralement fournies par l'instrument et se réfèrent aux gaz étalons utilisés pour l'analyse (CO_2 et N_2). Il est nécessaire de procéder à la correction et à la normalisation des données obtenues. Au moins deux matériaux de référence internationaux (voir tableau 4.3.) ou étalons de travail (préalablement étalonnés) devraient être placés au début et à la fin de la séquence analytique et avoir des valeurs certifiées aux extrémités de l'intervalle de mesure, à la fois pour l'analyse du carbone et pour l'analyse de l'azote. Les deux points fournis par les matériaux de référence (ou étalons de travail) permettent de construire une droite d'interpolation et de calculer l'équation correspondante qui sert ensuite à corriger l'ensemble des données obtenues.

7.2. Contrôle qualité des analyses

La valeur moyenne obtenue pour les étalons de travail ou internationaux utilisés par le laboratoire doit être comprise dans l'intervalle de validité établi par celui-ci lors de la phase d'étalonnage ou indiqué dans le certificat.

La différence entre les deux mesures répétées d'un même échantillon doit être inférieure à 0,3 ‰ pour l'analyse du carbone et 0,5 ‰ pour celle de l'azote.

7.3. Estimation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode

L'étude interlaboratoires a été conduite entre juin et septembre 2024, avec la participation de neuf laboratoires internationaux différents, et a permis d'estimer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. Des études de répétabilité et de reproductibilité ont ainsi été menées sur six échantillons de chitosane en double aveugle (soit douze échantillons au total) : quatre provenant de champignons et deux d'exosquelettes de crustacés, ayant des valeurs de $\delta^{13}C$ et de $\delta^{15}N$ différentes. Chaque laboratoire a également reçu deux étalons internationaux ayant des valeurs certifiées (acide L-glutamique USGS 40, de valeurs certifiées $\delta^{13}C = -26{,}39$ ‰ et $\delta^{15}N = -4{,}52$ ‰, et collagène porcin USGS 89, de valeurs certifiées $\delta^{13}C = -18{,}13$ ‰ et $\delta^{15}N = +6{,}25$ ‰) afin de procéder à la correction des données avec une droite à deux points.

En se basant sur les résultats obtenus (voir tableaux 1 et 2 en annexe VIII.1), il est possible d'estimer les paramètres de validation suivants :

$\delta^{13}C$ / ‰ vs V-PDB

Description de l'échant.	chitosane 1	chitosane 2	chitosane 3	chitosane 4	chitosane 5	chitosane 6
Nombre de rés. valides	9	9	9	9	9	9
Nombre de répétitions	2	2	2	2	2	2
Moyenne	−20,81	−25,36	−13,03	−25,73	−21,32	−14,04
S_r	0,04	0,07	0,09	0,07	0,07	0,08
S_R	0,14	0,09	0,23	0,10	0,16	0,21

$\delta^{15}N$ / ‰ vs AIR

Description de l'échant.	chitosane 1	chitosane 2	chitosane 3	chitosane 4	chitosane 5	chitosane 6
Nombre de rés. valides	9	9	9	9	9	9
Nombre de répétitions	2	2	2	2	2	2
Moyenne	−5,39	5,05	−5,41	2,92	−4,55	−7,15
S_r	0,08	0,12	0,09	0,08	0,13	0,15
S_R	0,11	0,19	0,11	0,14	0,23	0,15

7.4. Répétabilité et reproductibilité

Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats distincts obtenus sur un échantillon identique par un opérateur utilisant le même matériel dans l'intervalle de temps le plus court possible n'excèdera pas la limite de répétabilité *r* dans plus de 5 % des cas.

Les valeurs acceptées de l'écart-type de répétabilité (RSDr) sont égales à 0,09 ‰ pour le paramètre $\delta^{13}C$ et 0,15 ‰ pour $\delta^{15}N$.

Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats distincts obtenus sur un échantillon identique par deux laboratoires différents n'excèdera pas la reproductibilité *R* dans plus de 5 % des cas.

Les valeurs acceptées de l'écart-type de reproductibilité (RSDR) sont égales à 0,23 ‰ pour le paramètre $\delta^{13}C$ et 0,23 ‰ pour $\delta^{15}N$.

8. DIFFÉRENCIATION ENTRE LE CHITOSANE ISSU DE CHAMPIGNONS ET CELUI ISSU D'EXOSQUELETTES DE CRUSTACÉS

8.1. Valeurs limites à 95 % du $\delta^{13}C$ et du $\delta^{15}N$ pour un chitosane d'origine fongique authentique

Selon la littérature (Perini *et al*., 2020 et Claverie *et al*., 2023), le chitosane d'origine fongique authentique présente des valeurs de $\delta^{13}C$ supérieures à −14,2 ‰ ou inférieures à −24,9 ‰ (données disponibles dans le journal en accès libre cité). Le chitosane ayant une valeur de $\delta^{13}C$ comprise entre −24,9 ‰ et −25,1 ‰ devrait également faire l'objet d'une analyse du rapport $\delta^{15}N$ pour confirmer son origine fongique. Dans ce cas spécifique, la valeur du $\delta^{15}N$ doit être supérieure à +2,7 ‰.

8.2. Guide d'interprétation des données isotopiques

Les échantillons ayant des valeurs de $\delta^{13}C$ et de $\delta^{15}N$ supérieures ou inférieures aux valeurs limites à 95 % pour le chitosane d'origine fongique, telles que définies dans le point 8.1, auxquelles on ajoute (pour la limite supérieure) ou soustrait (pour la limite inférieure) l'incertitude calculée comme $2 \times S_R$ (voir point 7.4), doivent être considérés comme d'origine non fongique.

9. BIBLIOGRAPHIE

Codex œnologique international et *Code international des pratiques œnologiques*. Disponibles sur : http://www.oiv.int/. OIV COEI-1-CHITOS, Monographie sur le chitosane, 2009.

Perini, M., Nardin, T., Venturelli, M., Pianezze, S., et Larcher, R., « Stable isotope ratio analysis as a fast and simple method for identifying the origin of chitosan », *Food Hydrocolloids*, 2020, 101(105516), 105516.

Claverie, E., Perini, M., Onderwater, R. C. A., Pianezze, S., Larcher, R., Roosa, S., Yada, B., et Wattiez, R., « Multiple Technology Approach Based on Stable Isotope Ratio Analysis, Fourier Transform Infrared Spectrometry and Thermogravimetric Analysis to Ensure the Fungal Origin of the Chitosan », *Molecules*, 2023, 28(11). https://doi.org/10.3390/molecules28114324

Annexe VIII.1

RÉSULTATS DE L'ÉTUDE INTERLABORATOIRES

Le tableau 1 donne les résultats de $\delta^{13}C$ fournis par les différents laboratoires, avec une mention du Z-score.

Tableau 1 – $\delta^{13}C$ (‰ vs V-PDB)

Lab.	Éch. 7	Éch. 12	Z-score	Éch. 6	Éch. 11	Z-score	Éch. 1	Éch. 9	Z-score
1	−20,75	−20,69	0,63	−25,38	−25,43	−0,54	−13,04	−13,10	−0,19
2	−20,74	−20,74	0,48	−25,26	−25,30	0,86	−12,77	−12,87	0,92
3	−20,65	−20,76	0,73	−25,30	−25,32	0,52	−13,30	−13,21	−1,01
4	−20,84	−20,78	−0,02	−25,30	−25,28	0,75	−12,79	−12,92	0,76
5	−21,16	−21,05	−2,12	−25,14	−25,40	0,97	−13,12	−13,26	−0,72
6	−20,71	−20,68	0,81	−25,37	−25,50	−0,88	−13,34	−13,29	−1,27
7	−20,80	−20,82	−0,02	−25,37	−25,37	−0,15	−12,60	−12,72	1,62
8	−20,72	−20,75	0,52	−25,38	−25,40	−0,37	−13,08	−13,12	−0,32
9	−20,95	−20,95	−1,02	−25,52	−25,40	−1,16	−13,11	−12,85	0,21
Moy.		**−20,81**			**−25,36**			**−13,03**	

Lab.	Éch. 5	Éch. 8	Z-score	Éch. 3	Éch. 4	Z-score	Éch. 2	Éch. 10	Z-score
1	−25,77	−25,69	−0,02	−21,10	−21,19	1,07	−14,12	−14,13	−0,41
2	−25,61	−25,60	1,27	−21,49	−21,39	−0,72	−13,73	−13,86	1,17
3	−25,68	−25,68	0,49	−21,24	−21,30	0,31	−14,26	−14,30	−1,16
4	−25,65	−25,61	1,01	−21,33	−21,24	0,22	−13,89	−13,83	0,86
5	−25,81	−25,77	−0,64	−21,51	−21,72	−1,78	−14,19	−14,11	−0,53
6	−25,79	−25,88	−1,11	−21,17	−21,03	1,34	−14,20	−14,25	−0,89
7	−25,69	−25,67	0,49	−21,29	−21,25	0,31	−13,68	−13,75	1,55
8	−25,77	−25,81	−0,64	−21,39	−21,42	−0,51	−14,11	−14,19	−0,53
9	−25,68	−25,94	−0,85	−21,38	−21,35	−0,26	−13,91	−14,19	−0,05
Moy.		**−25,73**			**−21,32**			**−14,04**	

Le tableau 2 donne les résultats de $\delta^{15}N$ fournis par les différents laboratoires, avec une mention du Z-score.

Tableau 2 – $\delta^{15}N$ (‰ vs AIR)

Lab.	Éch. 7	Éch. 12	Z-score	Éch. 6	Éch. 11	Z-score	Éch. 1	Éch. 9	Z-score
1	−5,52	−5,49	−1,08	4,94	4,94	−0,59	−5,56	−5,50	−1,15
2	−5,30	−5,25	1,06	5,07	5,09	0,16	−5,36	−5,20	1,23
3	−5,40	−5,38	−0,01	5,01	5,01	−0,22	−5,41	−5,46	−0,24
4	−5,23	−5,41	0,64	5,11	4,79	−0,54	−5,29	−5,34	0,90
5	−5,43	−5,28	0,32	5,05	5,41	0,97	−5,33	−5,53	−0,20
6	−5,32	−5,19	1,24	4,73	4,79	−1,57	−5,39	−5,38	0,23
7	−5,55	−5,44	−0,99	5,12	5,01	0,08	−5,30	−5,57	−0,24
8	−5,50	−5,48	−0,94	5,08	5,10	0,22	−5,52	−5,50	−0,96
9	−5,39	−5,44	−0,24	5,30	5,35	1,49	−5,33	−5,40	0,42
Moy.		**−5,39**			**5,05**			**−5,41**	

Lab.	Éch. 5	Éch. 8	Z-score	Éch. 3	Éch. 4	Z-score	Éch. 2	Éch. 10	Z-score
1	2,77	2,85	−0,73	−4,70	−4,49	−0,21	−7,23	−7,21	−0,47
2	3,02	2,92	0,37	−4,46	−4,63	0,01	−7,04	−6,87	1,25
3	2,95	2,93	0,17	−4,50	−4,46	0,29	−7,13	−7,11	0,18
4	2,76	2,64	−1,49	−5,07	−4,68	−1,41	−6,91	−7,39	−0,02
5	3,15	3,15	1,62	−4,46	−4,32	0,68	−7,19	−7,42	−1,03
6	2,73	2,92	−0,63	−4,85	−4,66	−0,90	−6,99	−6,98	1,06
7	2,85	2,88	−0,35	−4,65	−4,81	−0,79	−7,04	−7,28	−0,08
8	2,94	2,96	0,23	−4,31	−4,28	1,09	−7,22	−7,21	−0,44
9	3,14	2,93	0,82	−4,28	−4,24	1,24	−7,16	−7,27	−0,44
Moy.		**2,92**			**−4,55**			**−7,15**	

CITRIQUE (ACIDE), MONOHYDRATE

Acide 3-Carboxy-3-hydroxypentanedioïque, monohydrate

Acidum citricum

$C_6H_8O_7$, H_2O = 210,1

N° SIN: 330

(Oeno 23/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'acide citrique peut être utilisé pour l'acidification chimique de vins ou pour son action stabilisante en particulier pour limiter les risques de casse ferrique ou encore pour le prélavage des plaques filtrantes. Sa teneur maximale dans le vin peut être soumise à limites réglementaires.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

L'acide citrique se présente sous forme de cristaux incolores, translucides, assez friables, légèrement efflorescents, ou sous forme de poudre cristalline.

$$D^{20°C}_{4°C} = 1,542$$

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C	très soluble
Alcool à 95 % vol.	très soluble
Glycérol	très soluble
Ether éthylique	31,5 g/l

La solution aqueuse d'acide citrique est inactive sur la lumière polarisée.

5. CARACTERES D'IDENTITE

5.1 Vérifier la totale solubilité dans l'eau. La solution à 1 p. 100 (m/v) présente une réaction acide vis-à-vis du méthylorange (R).

5.2 Dans un tube à essai, placer 2 ml d'une solution aqueuse à 1g/l d'acide citrique, 0,5 ml de solution de sulfate de mercure(II) (R), porter à l'ébullition et ajouter quelques gouttes de solution de permanganate de potassium de 2 p. 100 (R). Un précipité blanc se forme aussitôt.

5.3 A 0,1 ml d'une solution aqueuse d'acide citrique à 10 p. 100 (m/v), ajouter 1 goutte d'eau de brome (R), 3 gouttes d'acide sulfurique concentré (R), 1 goutte de solution saturée de permanganate de potassium (R). Porter à ébullition.

Ajouter 2 ml d'acide sulfurique concentré (R), chauffer à nouveau jusqu'à complète dissolution. Laisser refroidir, puis introduire 0,1 ml de solution de béta-naphtol (R). Il se développe une coloration verte. Avec le réactif sulforésorcinique (R), on obtient une coloration rose dans les mêmes conditions.

5.4 Dans un tube à essais, placer 5 ml de chloroforme ou de dichlorométhane, ajouter 100 à 200 mg d'acide citrique. Agiter. Les cristaux ou la poudre cristalline doivent se rassembler à la surface du liquide. Dans ces conditions, l'acide tartrique se rassemble tout au fond du tube.

6. ESSAIS

6.1 Matières étrangères

L'acide citrique devra être soluble sans résidu dans son poids d'eau et dans deux fois son poids d'alcool à 95 % vol.

6.2 Cendres sulfuriques

Les cendres sulfuriques obtenues selon la méthode décrite en annexe, après calcination à 600°C ± 25°C, doivent être inférieures à 0,5 g/kg.

6.3 Recherche de l'acide tartrique

A 2 ml d'acide sulfurique concentré (R), ajouter 2 gouttes de réactif sulforésorcinique (R), 2 gouttes de la solution à 10 p. 100 (m/v) d'acide citrique et chauffer à 150°C. La solution ne doit pas se colorer en violet.

6.4 Préparation de la solution pour essais

Préparer une solution à 10 p. 100 (m/v)

6.5 Chlorures

A 0,5 ml de solution préparée pour essais (6.4), ajouter 14,5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Après 15 minutes de repos à l'obscurité, on ne doit pas observer de trouble ou celui-ci doit être inférieur à celui du témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en chlorures exprimée en acide chlorhydrique inférieure à 1 g/kg).

6.6 Sulfates

A 1 ml de solution préparée pour essais (6.4), ajouter 18 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R) et 2 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R). Après 15 minutes on ne doit pas observer de trouble ou celui-ci doit être inférieur à celui présenté par le témoin, pour lequel on a remplacé la solution pour essai par 1 ml d'acide sulfurique à 0,1 g/l. (Teneur en sulfates exprimée en acide sulfurique inférieure à 1g/kg).

6.7 Acide oxalique et Baryum

Neutraliser par addition d'hydroxyde d'ammonium concentré (R) 5 ml de solution préparée pour essais (6.4), ajouter 2 gouttes d'acide acétique (R) et 5 ml de solution saturée de sulfate de calcium (R). Aucun trouble ne doit se produire. (Teneur en oxalate, exprimée en acide oxalique, inférieure à 0,1 g/kg).

6.8 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (6.4, ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge que l'on obtient doit être inférieure à celle obtenue en utilisant 1 ml de solution de sel de fer(III) (R) à 0,010 g de fer par litre, 9 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur en fer inférieure à 10 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

6.9 Cadmium

Sur la solution préparée pour essais (6.4), doser le cadmium selon la méthode décrite en annexe (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.10 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (6.4), doser le plomb selon la méthode figurant au Recueil. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.11 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (6.4), doser le mercure selon la méthode figurant en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.12 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (6.4), doser l'arsenic selon la méthode figurant en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

7. CONSERVATION

L'acide citrique doit être conservé dans un endroit sec et dans des sacs étanches.

SOLUTION COLLOIDALE DE DIOXYDE DE SILICIUM
Silica colloidalis solutio
GEL DE SILICE EN DISPERSION AQUEUSE
(Oeno 617-2019)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les solutions colloïdales de dioxyde de silicium sont des dispersions aqueuses de particules de dioxyde de silicium hydroxylées en surface et donc chargées négativement.

Le gel de silice correspond au dioxyde de silicium sous forme de poudre sèche.

Ces préparations sont utilisées pour la clarification des vins et sont associées à des clarifiants de nature protéique.

2. ÉTIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la concentration en dioxyde de silicium (pour les solutions) et les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

Selon leur mode de préparation, on obtient des solutions acides ou des solutions alcalines contenant des ions sodium exprimés en Na_2O; les plus utilisées sont les solutions alcalines.

Les solutions colloïdales de dioxyde de silicium sont exemptes de tout composé organique.

Leur concentration, déterminée par dessiccation à 110 °C, est toujours supérieure ou égale à 15 % (m/m), et le plus souvent comprise entre 15 et 30 %.

La masse volumique à 20 °C, ρ20 °C, des solutions colloïdales de dioxyde de silicium est donnée en fonction de la concentration C (m/m) par la relation :

$$\rho_{20\,°C} = \rho_{20\,°C}\,(\text{eau}) \times 1/1 - 0{,}0056\ C$$

$\rho_{20\,°C}$ (eau) = masse volumique de l'eau à 20 °C = 0,998203

Ces préparations sont commercialisées sous forme de liquides opalescents ou laiteux à reflets légèrement bleuâtres, ou sous forme de gel.

Le gel de silice sec est commercialisé sous la forme d'une poudre blanche à écoulement libre.

4. ESSAIS

4.1 La solution ou la poudre doit être sans odeur ou goût désagréable.

4.2 pH

En fonction du mode d'obtention, et selon qu'il s'agit de solutions acides ou de solutions alcalines, il doit être compris entre 3 et 4 ou entre 8 et 10,5.

Le pH de la poudre de dioxyde de silicium doit être compris entre 5,0 et 7,5 dans une solution aqueuse à 10 %.

4.3 Concentration en dioxyde de silicium (extrait sec à 110 °C)

Le poids du résidu sec P exprimé en g pour 100 g de solution colloïdale doit correspondre à $\pm$ 0,5 g près à la concentration du produit.

Pour la poudre, la perte à la dessication est déterminée par séchage à 110 °C pendant 4 heures. La perte de poids ne doit pas être supérieure à 12 % du poids initial. La concentration en dioxyde de silicium dans la poudre sèche après dessication doit être supérieure à 98 %.

4.4 Alcalinité

Pour les solutions colloïdales alcalines, déterminer l'alcalinité sur une prise d'essai de 5 g par l'acide chlorhydrique 0,1 M (R) en présence de 2 gouttes de solution de méthylorange (R). L'alcalinité exprimée en Na_2O pour 100 g de produit doit être inférieure à P/100.

4.5 Préparation de la solution pour essais

Placer un volume de solution colloïdale de dioxyde de silicium correspondant à 10 g d'extrait sec ou à 10 g de poudre sèche de dioxyde de silicium dans une capsule de platine de 7 cm de diamètre et 2,5 cm de haut et évaporer à sec. Reprendre après refroidissement par 5 mL d'acide fluorhydrique. Évaporer à sec. Répéter cette opération jusqu'à élimination du résidu de dioxyde de silicium. Évaporer à sec. Reprendre par 2 mL d'acide chlorhydrique concentré (R) et évaporer à sec. Ajouter 2 mL d'acide chlorhydrique concentré (R), transvaser dans une fiole jaugée de 50 mL et porter au trait avec de l'eau distillée. Les directives de sécurité applicables à l'utilisation d'acides concentrés doivent être respectées.

4.6 Métaux lourds

À 5 mL de la solution préparée pour essais (4.5), ajouter 5 mL d'eau, 2 mL de solution tampon pH 3,5 (R) et 1,2 mL de réactif au thioacétamide (R).

Aucun précipité ne doit se produire. Si une coloration apparaît, elle doit être moins intense que celle présentée par un témoin préparé conformément aux indications de l'annexe et porté à 25 mL.

La teneur en métaux lourds, rapportée à l'extrait sec et exprimée en plomb, doit être inférieure à 10 mg/kg.

4.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (4.5), doser le plomb selon la méthode décrite dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV.

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

4.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (4.5), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe.

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

4.9 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (4.5), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

4.10 Méthanol

Dans un ballon de 200 mL, introduire 50 mL de la solution colloïdale de dioxyde de silicium. Distiller et recueillir 50 mL de distillat.

Dans un tube à essai, placer 1 mL de distillat, 4 gouttes d'acide orthophosphorique à 50 % (m/m) (R), 4 gouttes de solution de permanganate de potassium à 5 % (m/v) (R), agiter et laisser au repos 10 minutes. Décolorer le permanganate par quelques gouttes (huit en général) de solution à 2 % (m/v) d'anhydrosulfite de potassium (R), en évitant tout excès. Ajouter 5 mL de solution sulfurique d'acide chromotropique (R). Placer dans un bain d'eau à 70 °C pendant 20 minutes. Aucune coloration violette ne devrait apparaître.

4.11 Formaldéhyde

Dans un tube à essai, placer 10 mL du distillat obtenu au point 4.10. Ajouter 1 mL de solution de chlorhydrate de rosaniline décolorée par l'acide sulfurique (R). Aucune coloration rose ne devrait apparaitre.

4.12 Taille moyenne (d50) et minimale des particules

La taille moyenne des particules de la poudre de dioxyde de silicium doit être comprise entre 10 et 100 µm, mesurée au moyen d'un granulomètre à diffraction laser après dispersion dans de l'eau déminéralisée. La taille minimale des particules doit être supérieure à 1 µm.

4.13 Surface spécifique (selon la méthode BET)

La surface BET de la poudre de dioxyde de silicium est mesurée par détermination de la surface spécifique de la matière solide par adsorption de gaz selon la norme ISO 9277:2010.

La surface spécifique (BET) de la poudre de dioxyde de silicium doit être comprise entre 300 et 500 m^2/g.

5. CONSERVATION

Les solutions colloïdales de dioxyde de silicium doivent être conservées dans des récipients hermétiquement clos à l'abri des contaminations et à des températures supérieures à 0 °C (le produit gèle à 0 °C, entraînant une précipitation irréversible du dioxyde de silicium).

La poudre de dioxyde de silicium doit être stockée dans des sacs ou récipients étanches, à l'abri des odeurs et de l'humidité.

CUIVRE (SULFATE DE), PENTAHYDRATE
Sulfate de cuivre (II), pentahydrate
$CuSO_4, 5H_2O = 249,68$
(Oeno 25/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le sulfate de cuivre est utilisé dans le traitement des vins présentant des " goûts " dits de réduction dus à la présence de sulfure d'hydrogène ou de thiols volatils.

Les sulfures de cuivre formés précipitent et doivent être éliminés du vin.

Son utilisation est soumise au respect des apports limites en sulfate cuivre pentahydrate et, par ailleurs, il existe des limites réglementaires à la teneur en cuivre du vin.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

Cristaux bleus, peu efflorescents à l'air sec.

4. COMPOSITION

99 p. 100 minimum de $CuSO_4, 5H_2O$

5. CARACTERES D'IDENTITE

Point de fusion : 110°C avec cession d'eau.

La solution aqueuse donne avec l'hydroxyde d'ammonium (R) un complexe bleu foncé de tétramine de cuivre.

La solution acidifiée à l'acide chlorhydrique donne avec une solution de chlorure de baryum (R) un précipité blanc de sulfate de baryum.

6. SOLUBILITE

Eau à 20°C 286 g/l
Méthanol 15,6 g/l
insoluble dans l'éthanol (alcool à 95 % vol.)

7. ESSAIS

7.1 Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 10 g de substance dans de l'eau et compléter à 50 ml.

7.2 Aspect de la solution pour essais

Il faut que la solution pour essais soit limpide.

7.3 Fer

Mettre dans une ampoule à décanter 2 ml de solution préparée pour essais (7.1), ajouter 8 ml d'eau, 10 ml d'acide chlorhydrique 6 M (R) et 10 ml de 4-méthylpentan-2-one, puis agiter fortement pendant 3 minutes. Après avoir laissé déposer, transvaser la phase organique dans une deuxième ampoule à décanter, ajouter 10 ml d'eau, puis agiter de nouveau fortement pendant 3 minutes. Séparer la phase aqueuse et la soumettre à l'essai de la façon suivante :

Ajouter à la phase aqueuse 2 ml de solution d'acide citrique (20 g d'acide citrique/100 ml), 0,10 ml d'acide thioglycolique concentré ($HS\text{-}CH_2\text{-}COOH$) et un peu de solution d'hydroxyde d'ammonium 6 M (10 à 10,4 g NH_3/100 ml) jusqu'à réaction alcaline et diluer avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume total de 20 ml. Au bout de 5 minutes, l'échantillon ne doit pas être plus coloré que l'essai effectué avec la solution de comparaison décrite ci dessous.

7.3.1 Préparation de la Solution de comparaison

7.3.1.1 Solution 1 de sulfate d'ammonium et de fer (III)

Dissoudre 0,702 g de sulfate d'ammonium et de fer (III) dans 1,20 ml d'acide chlorhydrique 6 M et compléter à 100 ml avec de l'eau.

7.3.1.2 Solution 2 de sulfate d'ammonium et de fer (III)

Prélever 7 ml de solution 1 de sulfate d'ammonium et de fer (III) (7.3.1.1) et compléter à 100 ml avec de l'eau.
1 ml de solution 2 correspond à 10 µg de Fe(III).

7.3.2 Essai avec la solution de comparaison

La solution de comparaison doit être préparée juste avant l'emploi de la façon suivante:

Prendre 1 ml de solution 2 de sulfate d'ammonium et de fer (III) (2) et traiter de la même façon que pour l'essai de la substance.

Remarque Il est également possible de doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au Recueil.

La limite en fer est de 100 mg/kg.

7.4 Nickel

Ajouter à la phase aqueuse du point 7.3, 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 1 ml d'acide nitrique concentré (R). Après évaporation de la solution, dissoudre le résidu dans 1 ml d'acide nitrique 6 M (R) et 19 ml d'eau. Diluer 1 ml de cette solution jusqu'à un volume total de 10 ml. Prendre 2,50 ml de cette solution diluée, y ajouter 6 ml d'eau, 5 ml de solution de brome (R), 7 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium 6 M et 3 ml de solution de diméthylglyoxime à 100 g dans 100 ml d'éthanol à 96 % vol. La solution ne doit pas présenter de modification au bout d'une minute par rapport à un échantillon blanc.

Le nickel peut également être dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique.

7.5 Chlorures

Diluer 25 ml de solution préparée pour essais (7.1) avec 10 ml d'eau. Après avoir ajouté 8 ml d'hydroxyde de sodium 6 M, porter à ébullition et chauffer le mélange sur bain d'eau à 100°C jusqu'à ce que le précipité soit complètement déposé. Après refroidissement, diluer avec de l'eau pour obtenir un volume total de 50 ml. Prendre 4 ml de filtrat, ajouter 6 ml d'eau et procéder à l'essai de la façon suivante : ajouter 1 ml d'acide nitrique 6 M (R) et 1 ml de solution de nitrate d'argent 0,1 M (R). Au bout de 5 minutes, agiter l'échantillon : il ne devra pas être plus trouble que l'essai témoin effectué avec la solution de comparaison. (limite 100 mg/kg).

7.5.1 Préparation de la solution de comparaison

Diluer 4 ml de solution de chlorure de sodium 0,1 M avec de l'eau jusqu'à un volume total de 100 ml, ce qui correspond à 142 µg Cl^-. Préparer la solution juste avant l'emploi

7.5.2 Essai témoin avec la solution de comparaison.

Prendre 1 ml de la solution de chlorure de sodium (7.5.1) et procéder de la même manière que pour l'essai de la substance.

7.6 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser le plomb selon la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

7.7 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

7.8 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (7.1), rechercher l'arsenic par la méthode décrite en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

7.9 Dosage

Peser exactement 0,50 g de substance, les dissoudre dans 20 ml d'eau et ajouter 5 ml d'acide acétique 6 M et 2 g d'iodure de potassium. Titrer avec une solution de thiosulfate de sodium 0,1 M en présence d'empois d'amidon (R).

1 ml de solution de thiosulfate de sodium 0,1 M correspond à 6,354 mg Cu(II) ou, si l'on exprime le résultat en substance, à 24,97 mg de $CuSO_4.5H_2O$.

8. CONSERVATION

Le sulfate de cuivre doit être conservé à l'abri de l'humidité et dans des récipients hermétiquement clos.

CITRATE DE CUIVRE X 2,5-HYDRATE
hémipentahydrate de citrate de cuivre
$Cu_2C_6H_4O_7$ x 2,5 H_2O
Numéro CAS : 10402-15-0
Poids moléculaire : 360 g/mol
(OIV-OENO 413-2011)

1. Objet, origine et domaine d'application
Le citrate de cuivre est utilisé pour le traitement des vins afin d'éliminer les goûts anormaux liés à la fermentation et au stockage (goûts anormaux liés au sulfure, goûts causés par les phénomènes de réduction ou par la présence d'acide sulfhydrique et de mercaptans).
Le sulfure de cuivre formé au cours du traitement précipite dans le vin car il s'agit d'un composé très peu soluble qui peut être séparé par filtration.

L'adjonction au vin peut être effectuée directement, ou idéalement à l'aide de bentonites en guise de support. Les exigences en matière de pureté établies dans la résolution OENO 11/2003 s'appliquent à la bentonite utilisée.
L'addition au vin est limitée (résolution OENO 1/2008), il convient d'observer les limites réglementaires relatives à la teneur maximale en cuivre du vin.

2. Étiquetage
La concentration du produit, le numéro de lot, la date d'expiration ainsi que les conditions de sécurité et de stockage doivent être indiquées sur l'étiquette.

3. Caractères
Cristaux granulaires de couleur vert clair/bleu clair.

4. Composition (Analyse)
Minimum de 98 % de citrate de cuivre x 2,5-hydrate.
Avec produits sur support, un minimum de 2 % de citrate de cuivre x 2,5-hydrate.

5. Identification

Le citrate de cuivre dissout dans 10 % d'acide nitrique réagit à l'hydroxide d'ammonium (R) en formant un complexe bleu foncé de tétramine de cuivre.
Tout chauffage à sec à plus de 180°C entraîne la carbonisation du citrate.

6. Solubilité

Moins de 0,05 g/l dans l'eau à 20°C, dans le méthanol et l'éthanol.
Environ 250 g/l dans du HCl à 10 % (R).
Environ 140-150 g/l dans du HNO_3 à 10 % (R).

7. Essais

7.1 Préparation de la solution d'essai
Dissolution de 10 g de citrate de cuivre dans 100 ml de HNO_3 à 10 % (R).

7.2 Aspect de la solution d'essai
La solution est bleu clair.

7.3 Fer
Détermination par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) ; teneur inférieure à 200 mg/kg.

Remarque :
La méthode décrite dans la résolution (OENO 25/2000) de l'OIV entraîne l'élimination par dissolution du fer de la solution d'essai après agitation de la solution avec du 4-méthylpentan-2-one puis transfert dans la phase organique. La concentration en fer dans la phase organique n'est pas déterminée. L'analyse porte uniquement sur la présence éventuelle de fer dans la seconde phase aqueuse.
Grâce à la technique SAA, la teneur en fer peut être mesurée de façon immédiate et précise.
Avec un maximum de 200 mg de fer par kilogramme de citrate de cuivre et un traitement à raison de 1g de citrate de cuivre pour 100 litres de vin au maximum, l'augmentation de la concentration en fer dans le vin s'élève au maximum à 0,002 mg par litre ; elle est par conséquent négligeable.

7.4 Nickel
Détermination par Spectrophotométrie à absorption atomique (SAA) ; teneur inférieure à 5 mg/kg.

7.5 Chlorure
Ajouter 1 ml de solution de nitrate d'argent 0,1 M à 4 ml de la solution d'essai. Après 5 minutes mélanger l'échantillon.
La turbidité ne doit pas dépasser celle de l'essai effectué avec la solution de référence.

Solution de référence:
Diluer 4 ml de solution de chlorure de sodium 0,1 M avec de l'eau et compléter à 100 ml.
Essai à blanc :
1 ml de solution de référence fraîchement préparée est utilisé à la place de la solution d'essai. Suivre la procédure d'essai indiquée ci-dessus.

Remarque :
Un traitement préliminaire de la solution d'essai n'est pas nécessaire, puisqu'il s'agit d'acide nitrique.

7.6 Plomb
Détermination par Spectrophotométrie à absorption atomique (SAA); teneur inférieure à 5 mg/kg.

7.7 Mercure
Détermination par Spectrophotométrie à absorption atomique (SAA); teneur inférieure à 1 mg/kg.

7.8 Arsenic
Détermination par Spectrophotométrie à absorption atomique (SAA); teneur inférieure à 3 mg/kg.

7.9 Analyse
Verser 1 ml de solution d'essai, 20 ml d'eau, 2 ml d'acide acétique 6 M, 2 g d'iodure de potassium et 2 ml de solution d'amidon (R) dans un récipient de titrage. Le titrage est effectué avec une solution de thiosulfate de sodium 0,1 M jusqu'à changement de couleur de la solution.

Une consommation de 1 ml de solution de thiosulfate de sodium correspond à 6,354 mg de Cu(II), soit 18 mg de citrate de cuivre.

8. Stockage

Le citrate de cuivre doit être stocké au sec, protégé des odeurs dans des emballages hermétiquement fermés.

D,L-TARTRIQUE (ACIDE)

Acide D,L-2,3-dihydroxybutanedioïque
Acide racémique
Acidum tartaricum
COOH - CHOH - CHOH - COOH
$C_4H_6O_6$ = 150,1
(Oeno 48/2000 modifiée par Oeno 4/2007)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit utilisé pour éliminer un excès de calcium des moûts et des vins sous certaines conditions. Le racémate de calcium formé donne des sels particulièrement insolubles. Son emploi est soumis au respect de certaines règles

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner le taux de pureté et les conditions de conservation.

Elle doit aussi clairement indiquer qu'il s'agit du mélange racémique des deux isomères D et L de l'acide tartrique afin de ne pas laisser supposer qu'il s'agit de l'acide L-tartrique naturel du raisin.

3. CARACTERES

Cristaux incolores, transparents, très résistants, de saveur franchement acide. Point de fusion instantanée 206 °C.[5]

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C	245 g/l
Eau à 100°C	1428 g/l
Alcool à 95 % vol.	26 g/l
Ether éthylique	14,9 g/l

5. CARACTERES D'IDENTITE

[5] Suite à une erreur d'impression la valeur du point de fusion a été corrigée

5.1 - Vérifier la totale solubilité dans l'eau ; la solution à 1 p. 100 présente une réaction acide vis-à-vis du méthylorange (R). Le pouvoir rotatoire de cette solution est nul.

5.2 - A 5 ml de solution à 1 p. 100 (m/v), ajouter 2 ml de solution d'acétate de calcium à 25 % (R). Un précipité cristallin blanc très abondant se forme instantanément. Dans ces conditions, l'acide L(+)tartrique (ou acide tartrique droit) ne donne pas de précipité.

5.3 - A 5 ml de solution à 10 p. 100 (m/v), ajouter 2 ml de solution d'acétate de potassium à 5 p. 100 (R). Un précipité cristallin se forme.

6. ESSAIS

6.1 Matières étrangères

L'acide D,L-tartrique doit être soluble sans résidu dans dix fois son poids d'eau.

6.2 Cendres sulfuriques

Déterminées sur 2,0 g d'acide D,L-tartrique, le taux des cendres sulfuriques ne devra pas être supérieur à 0,2 p. 100.

6.3 Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 10 g d'acide D,L-tartrique dans de l'eau et compléter à 100 ml avec le même solvant.

6.4 Acide citrique

A 5 ml de la solution préparée pour essais (6.3), ajouter 5 ml d'eau, 2 ml de solution de sulfate de mercure(II) (R) , porter à ébullition et ajouter quelques gouttes de la solution de permanganate de potassium à 2 p. 100 (R). Aucun précipité blanc ne devra se former.

6.5 Chlorures

A 0,5 ml de solution préparée pour essais (6.3), ajouter 14,5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). La solution devra satisfaire à l'essai limite des chlorures décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 g/kg exprimée en acide chlorhydrique).

6.6 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (6.3), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge obtenue ne devra pas être plus intense

que celle d'un témoin préparé avec 1 ml d'une solution de sel de fer(III) à 0,010 g de fer par litre (R), 9 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur inférieure à 10 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

6.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (6.3), appliquer la méthode décrite au Recueil. (Teneur en inférieure à 2 mg/kg).

6.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (6.3), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.9 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (6.3), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

6.10 Sulfates

A 1 ml de solution préparée pour essais (6.3), ajouter 18 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R) et 2 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R). La solution devra satisfaire à l'essai limite des sulfates décrit en annexe. (Teneur inférieure à 1 g/kg, exprimée en acide sulfurique).

6.11 Oxalate

Sur la solution préparée pour essais (6.3), doser l'oxalate selon la méthode décrite en annexe. (Teneur, exprimée en acide oxalique, inférieure à 100 mg/kg après dessiccation).

7. DOSAGE

Dissoudre dans 10 ml d'eau une prise d'essai **p** exactement pesée voisine de 1 g d'acide D,L-tartrique. Titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium 1 M (R) en présence de phénolphtaléine (R). Soit **n** le nombre de millilitres employés.

1 ml de solution d'hydroxyde de sodium 1 M correspond à 0,075 g d'acide D,L-tartrique.

Teneur pour cent en acide D,L-tartrique du produit essayé:

7,5 **n**

Le produit oenologique doit contenir au minimum 99 p. 100 d'acide D,L-tartrique, rapporté au produit desséché.

8. CONSERVATION

L'acide D,L-tartrique doit être conservé dans des récipients hermétiquement clos.

di-AMMONIUM (HYDROGENOPHOSPHATE)
AMMONIUM (HYDROGENOPHOSPHATE D')
Phosphate diammonique
Ammonii phosphas
$(NH_4)_2HPO_4$ = 132,1
N° SIN: 342
(Oeno 15/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit employé en tant qu'activateur de fermentation, réservé aux opérations fermentaires, il apporte l'ion ammonium directement assimilable par les levures.
Un excès de phosphates peut entraîner une casse ferrique.

Il existe des limites réglementaires concernant l'apport d'ammonium.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de sécurité et de conservation, avec une date limite d'utilisation.

3. COMPOSITION CENTÉSIMALE

H_3PO_4	74,21
P_2O_5	53,75
NH_3	25,79

4. CARACTERES

Cristaux monocliniques, incolores. Ce sel perd lentement de petites quantités d'ammoniac à l'air.

5. SOLUBILITE

Eau à 20°C	689 g/l
Eau à 100°C	1060 g/l
Alcool à 95 % vol.	insoluble

6. CARACTERES D'IDENTITE

6.1 Préparer une solution à 1 p. 100 (m/v) dans l'eau. La solution présente un pH voisin de 8, elle donne une coloration légèrement rosée avec quelques gouttes de phénolphtaléine (R). A 25°C, le pH de cette solution doit être compris entre 7,8 et 8,4.

6.2 Cette solution donne un précipité jaune avec le réactif nitromolybdique (R).

6.3 Cette solution, chauffée avec quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium à 30 % (R), dégage de l'ammoniac.

7. ESSAIS

7.1 Cendres sulfuriques

Le taux de cendres sulfuriques du phosphate diammonique déterminé comme il est indiqué en annexe, ne doit pas être supérieur à 5 g/kg.

7.2 Préparation de la solution pour essais

Préparer une solution à 10 p. 100 (m/v)

7.3 Chlorures

A 0,5 ml de solution préparée pour essais (7.2) ajouter 14,5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Après 15 minutes de repos à l'obscurité, on ne doit pas observer de trouble, ou celui-ci doit être inférieur à celui du témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en acide chlorhydrique inférieure à 1 g/kg).

7.4 Sulfates

A 1 ml de la solution préparée pour essais (7.2), ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R), 17 ml d'eau et 2 ml de solution de chlorure de baryum (R). Le mélange ne doit montrer ni précipité, ni opalescence, ou celle-ci ne doit pas être plus intense que celle du témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en acide sulfurique inférieure à 1g/kg).

7.5 Acide oxalique

A 5 ml de solution préparée pour essais (7.2), ajouter 20 gouttes d'acide acétique (R) et 5 ml de solution saturée de sulfate de calcium (R). La solution doit rester limpide.

7.6 Fer

A 5 ml de solution préparée pour essais (7.2), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 1 ml d'une solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).
La coloration doit être moins intense que celle obtenue avec 2,5 ml de solution de fer à 10 mg par litre (R), 2,5 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur en fer inférieure à 50 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

7.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (7.2), faire le dosage selon la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

7.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (7.2), rechercher le mercure par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

7.9 Arsenic

Sur 2 ml de solution préparée pour essais (7.2), rechercher l'arsenic par la méthode indiquée en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

7.10 Dosage de l'ammoniac

Introduire 10 ml de la solution préparée pour essais (7.2) préalablement diluée au dixième (soit 0,10 g de phosphate d'ammonium) dans l'appareil à entraînement par vapeur d'eau (décrit en annexe), 10 ml d'eau, 10 ml d'hydroxyde de sodium à 30 % (R), et distiller 10 ml. Doser l'ammoniac distillé par l'acide chlorhydrique 0,1 M. Soit **n** ml de volume employé :

100 g de phosphate d'ammonium contiennent 1,7 ***n*** g d'ammoniac (NH_3). (Teneur minimale 25 p. 100)

7.11 Dosage de l'acide phosphorique

Placer 25 ml de la solution préparée pour essais (7.2) dans une fiole conique. Ajouter 5 gouttes de phénolphtaléine (R) ; la solution doit être colorée en rose pâle ; sinon, ajouter la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M en quantité juste suffisante pour obtenir le virage commençant de cet indicateur. Ajouter 10 gouttes de vert de bromocrésol (R) et verser avec une burette de l'acide sulfurique 0,5 M jusqu'à obtention du virage au vert de l'indicateur.
Soit ***n*** ml de volume ainsi utilisé :

Un litre de solution 0,5 M correspond à 71 g d'anhydride phosphorique ou 98 g d'acide phosphorique.

Teneur du phosphate d'ammonium en g p. 100 g :

- en anhydride phosphorique 2,84 ***n***
- en acide phosphorique 3,92 ***n***

La teneur en anhydride phosphorique doit être comprise entre 51,6 et 55 p. 100, soit entre 71,5 et 76 p. 100 en acide phosphorique.

8. CONSERVATION

Le phosphate d'ammonium doit être conservé à l'abri de l'humidité, de la chaleur et dans des récipients hermétiquement clos.

DIATOMITE
Kieselguhr
Terre d'infusoires
(Oeno 10/2002)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Roche sédimentaire constituée essentiellement des carapaces siliceuses (tests) de diatomées (algues microscopiques unicellulaires) fossiles.
Pour être utilisée en oenologie, cette roche est concassée, séchée, broyée, épurée par lavage et calcinée à haute température (950 à 1100°C). Au cours de cette calcination on peut ajouter des fondants alcalins.
Elle est utilisée à l'état pulvérulent de granulométrie comprise entre 5 et 40 microns et se présente sous l'aspect d'une poudre rose pour les produits calcinés ou blanche pour les produits calcinés et activés.
La diatomite est un adjuvant de filtration des moûts et des vins.
L'utilisation de diatomite nécessite le port d'un masque de protection pour les travailleurs exposés.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la granulométrie, la perméabilité, les spécifications des documents d'accompagnement ainsi que les conditions de sécurité et de conservation.

3. ESSAIS

3.1 Odeur et goût

La diatomite ne doit communiquer ni odeur ni goût étranger au vin. Placer 2,5 g de diatomite dans un litre de vin. Agiter. Laisser reposer 24 heures. Déguster par rapport au même vin n'ayant pas reçu de diatomite.

3.2 Perte à la dessiccation

Placer dans une capsule environ 5 g de diatomite. Porter à l'étuve à 103 $\pm$ 2°C. Après deux heures la perte de poids ne doit pas être supérieure à 1 p. 100.

3.3 Perte à la calcination
Porter le résidu sec obtenu au point 3.2 dans un four à 550°C ; la perte de poids ne doit pas dépasser 3 p. 100.

3.4 Mesure du pH.
Dans un récipient de 250 ml, placer 10 g environ de diatomite puis verser lentement, en agitant manuellement, 100 ml d'eau pour mouiller le produit et réaliser une suspension homogène. Agiter de temps en temps manuellement ou à l'aide d'un agitateur magnétique. Après 10 minutes, laisser reposer la suspension et mesurer le pH. Les diatomites calcinées (roses) ont un pH compris entre 5 et 7,5 et les diatomites calcinées activées (blanches) ont un pH compris entre 6 et 10,5.

3.5 Produits solubles dans les acides dilués
Traiter à l'ébullition 10 g de diatomite séchée par 20 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 100 ml d'eau. Recueillir la diatomite sur un filtre sans cendres et laver le résidu avec 100 ml d'eau distillée. Après dessiccation à 100-105°C et incinération, séparé du filtre le résidu insoluble devra peser au moins 9,8 g soit 98 p. 100 du produit sec.

3.6 Préparation de la solution pour essais
Dans un flacon de 500 ml, pouvant être hermétiquement bouché, placer 200 ml de solution d'acide citrique à 5 g par litre amené à pH 3 (R) et 10 g de diatomite. Placer sur un agitateur magnétique et agiter pendant 1 heure à une température de 20 $\pm$ 2°C. Laisser reposer puis filtrer en éliminant les 50 premiers ml de filtrat. Recueillir au moins 100 ml de liquide clair.

3.7 Fer
Sur la solution pour essais préparée selon le point 3.6, procéder au dosage du fer selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en fer doit être inférieure à 300 mg/kg.

3.8 Plomb
Sur la solution pour essais préparée selon le point 3.6, procéder au dosage du plomb selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

3.9 Mercure

Sur la solution pour essais préparée selon le point 3.6, doser le mercure selon la méthode figurant au Chapitre II.
La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg.

3.10 Arsenic

Sur 4 ml de la solution pour essais préparée selon le point 3.6, doser l'arsenic selon la méthode figurant au Chapitre II.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

4. CONSERVATION

La diatomite doit être conservée dans des endroits secs bien ventilés dans des sacs étanches sous vide et dans des locaux tempérés.

DICARBONATE DE DIMETHYLE (DMDC)
Pyrocarbonate de diméthyle

N° SIN = 242
C.A.S 004-525-33-1
(Oeno 25/2004 modifiée par Oeno 4/2007)

EINECS 224-859-8
Formule chimique : $C_4H_6O_5$
$H_3C\text{-}O\text{-}(C{=}O)\text{-}O\text{-}(C{=}O)\text{-}O\text{-}CH_3$,
Poids moléculaire 134,09

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Antiseptique principalement actif contre les levures. Produit de synthèse.

2. ETIQUETAGE

Doivent être indiquée sur l'étiquette le nom « Dicarbonate de diméthyle », le numéro de lot, la date limite d'utilisation, la température de stockage (20 – 30 °C) et les consignes de sécurité.

3. CARACTERES

Liquide incolore, se décompose en solution aqueuse. Corrosif pour la peau et les yeux, toxique en cas d'inhalation et d'ingestion.
Après dilution dans l'eau, il se forme du CO_2, qui peut être caractérisé.

Point de fusion : 17 °C.

Point d'ébullition : 172 °C avec décomposition.

Densité à 20 °C : environ 1,25.

Spectre infrarouge : absorption maximum à 1156 nm et 1832 nm.

4 CARACTERISATION

4.1 Principe de la méthode

L'échantillon est mélangé avec un excès de dibutylamine, avec laquelle il réagit directement. L'excès d'amine est dosé en retour avec un acide.

4.2 Appareils

4.2.1 Vase cylindrique de 150 ml
4.2.2 Eprouvette graduée de 100 ml
4.2.3 Pipette de 20 ml
4.2.4 Electrode en verre / électrode de référence
4.2.5 pH mètre
4.2.6 Burette à piston de 20 ml
4.2.7 Agitateur magnétique
4.2.8 Seringue jetable de 2 ml

4.3 Réactifs

4.3.1 Acétone pure
4.3.2 Solution molaire de dibutylamine [$C_8H_{19}N$] = 1 mol/l
Peser 128 g de dibutylamine, ajouter du chlorobenzène jusqu'au trait de jauge de la fiole de 1 litre.
4.3.4 Solution molaire d'acide chlorhydrique [HCl] = 1 mol/l
Déterminer la concentration massique par titrage au carbonate de sodium. Titre : t
4.3.5 Carbonate de sodium anhydre, desséché à l'étuve à 110 °C.

4.4 Mode Operatoire

Verser environ 70 ml d'acétone (4.3.1) dans le vase cylindrique de 150 ml
Introduire à l'aide de la seringue jetable (4.2.8) et sous pesée (précision de ± 0,1 mg) 1,0 à 1,3g (W) d'échantillon dans le vase cylindrique 4.2.1

Ajouter exactement 20 ml de la solution de dibutylamine (4.3.2) à l'aide de la pipette (4.2.3) et agiter énergiquement.

4.4.1 Titrer par potentiométrie l'excès d'amine avec l'acide chlorhydrique (4.3.4). Consommation de solution d'HCl = V1 ml.

4.4.2 Effectuer un essai témoin selon 4.4, mais sans ajouter d'échantillon. Consommation de solution d'HCl = V2 ml.

4.5 Résultat

$$\frac{(V2-V1) \cdot t \cdot 134{,}1 \cdot 100}{1000 \cdot W} = \frac{(V2-V1) \cdot t \cdot 13{,}41}{W} = \%\ \text{dicarbonate de diméthyle}$$

La teneur en DMDC doit être supérieure ou égale à 99,8%

5. TENEUR EN METAUX LOURDS (EXPRIMEE EN PLOMB), EN MERCURE ET EN CHLORE

5.1 Solution tampon, pH = 3,5 : dissoudre 6,25 g d'acétate d'ammonium dans 6 ml d'eau, ajouter 6,4 ml d'acide chlorhydrique et diluer à l'eau jusqu'à 25 ml.

5.2 Solution pour essais : verser dans une fiole conique 5 ml de solution tampon, 25,0 g d'échantillon et environ 15 ml d'eau. Laisser l'échantillon s'hydrolyser pendant 3 jours, en secouant de temps en temps. Transférer la solution dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter avec de l'eau jusqu'au repère.

5.3 Métaux Lourds

Déterminer la teneur en métaux lourds selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en métaux lourds doit être inférieure à 10 mg/kg

5.4 Mercure

A partir de la solution pour essais (5.2), doser le mercure selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international. La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg

5.5 Chlore

A partir de la solution pour essais 5.2 (donc diluée 2 fois par rapport à la teneur initiale), doser le chlore selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en chlore doit être inférieure à 3 mg/kg.

6. DOSAGE DE L'ARSENIC, DU PLOMB, ET DU CADMIUM PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

6.1 Préparation de la solution pour essais

Pour le dosage de l'arsenic, du plomb, et du cadmium, peser environ 100 g d'échantillon avec une précision de $\pm$ 0,1 g dans un vase cylindrique
Ajouter 200 ml d'eau et 5 ml d'acide sulfurique pur (R) et concentrer sur une plaque chauffante jusqu'à apparition des premières vapeurs d'acide sulfurique.
Rediluer la solution à l'eau et ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique pur (R). Verser en rinçant dans la fiole jaugée de 50 ml et compléter à l'eau jusqu'au repère.

6.2 Arsenic

A partir de la solution pour essais (6.1), doser l'arsenic selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international. La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

6.3 Plomb

A partir de la solution pour essais (6.1), doser le plomb selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international. La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

6.4 Cadmium

A partir de la solution pour essais (6.1), doser le cadmium selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 0,5 mg/kg.

7. DOSAGE DU CARBONATE DE DIMETHYLE

La teneur en carbonate de diméthyle doit être inférieure à 0,2 %.

7.1 Principe de la méthode

La concentration de carbonate de diméthyle est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. L'évaluation quantitative est effectuée en utilisant la méthyl-isobutylcétone comme étalon interne.

7.2 Appareils

7.2.1 Chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme et colonne capillaire (de type apolaire« SE 30 » ou autre ; une colonne polaire peut aussi être utilisée de type Carbowax 20 M), 50m x 0,3 mm.

7.2.2 Système d'acquisition des données.

7.2.3 Seringue à aiguille de quartz d'une contenance de 10 µl et utilisable pour l'injection dans la colonne (injection « on column ») (cf. remarque 7.7).

7.2.4 Flacon antibiotique de 10 ml à bouchon téfloné pouvant être scellé avec une capsule en aluminium à partie supérieure déchirable.

7.3 Etalon interne

Méthyl-isobutylcétone ultra pure

7.4 Mode opératoire

7.4.1 Peser environ 1 g d'échantillon à ± 1 mg (W1 mg) dans un flacon 7.2.4

7.4.2 Ajouter une quantité d'étalon interne (W2 mg) de méthyl-isobutylcétone (7.3) correspondant à 10 mg/kg après ajout (soit 10 µl par exemple)

7.4.3 Sceller le flacon, mélanger énergiquement et injecter 0,2 µl.

7.4.4 Déterminer l'aire du pic correspondant à l'étalon interne (F 2) et celle correspondante au carbonate de diméthyle (F 1)

7.5 Résultat

$$\frac{W2 \cdot F1 \cdot K \cdot 100}{F2 \cdot W1} = \% \text{ masse de carbonate de diméthyle}$$

K = Facteur de réponse pour le carbonate de diméthyle calculé à partir de solutions de références de cette substance préparées de préférence dans du DMDC exempt de carbonate de diméthyle

7.6 Remarque 1

L'échantillon préparé avec le standard doit être analysé immédiatement.

7.7 Remarque 2

Une décomposition partielle du DMDC peut survenir au contact du métal des aiguilles de seringues traditionnelles.

8. CONSERVATION

Le DMDC doit être conservé dans des récipients parfaitement étanches à une température comprise entre 20 et 30 °C. Sa durée de conservation est de 12 mois.

ŒUF (ALBUMINE D')
Ovalbumine
Albumen ovi
(Oeno 32/2000, Oeno 650-2019)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'albumine d'œuf, obtenue par dessiccation des blancs d'œufs frais, se présente sous forme d'une poudre blanche, fine, très légère, incomplètement soluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions alcalines.

Agent de collage pour la clarification des vins.

L'albumine d'œuf est proposée sous forme de poudre ou spray ou peut-être utilisée directement en prenant l'albumen d'œufs frais ou stérilisés.

L'albumine d'œuf est précipitée par le tanin. Il faut en général 2 g de tanin pur pour précipiter 1 g d'albumine d'œuf.

2. ETIQUETAGE

Les conditions de conservation, d'hygiène et de sécurité doivent être indiquées sur l'étiquette ainsi que la date limite d'utilisation optimale.

3. CARACTERISATION

3.1 Préparation d'une solution à 10 g/l et caractères

3.1.1 Préparer une solution d'albumine d'œuf en délayant la poudre avec une très petite quantité d'eau, pour former une pâte homogène, délayer ensuite progressivement pour obtenir une solution à 10 g/l. Cette solution doit être sans goût ou odeur désagréable.

Cette solution a un pH compris en 6,5 et 7 ; elle mousse abondamment par agitation et est coagulée par la chaleur en présence de sels neutres.

L'ovalbumine précipite de ses solutions par le sulfate d'ammonium dissous à saturation, par l'acide nitrique et par l'alcool.

3.1.2 Dans le cas d'albumine d'œuf frais, le pH est compris entre 8,5 et 9,5.

3.2 Recherche de gomme, dextrine et gélatine

A 10 ml d'une solution à 10 g/l (3.1), ajouter 0,5 ml d'acide nitrique concentré (R). Porter à 50-60°C. Il se forme un précipité. Laisser refroidir ; filtrer. Le filtrat doit être incolore et limpide ; il ne doit pas se colorer par addition d'une

solution iodo-iodurée (R) et il ne doit pas se former un anneau opalescent lorsqu'on superpose sans mélange à 5 ml de filtrat, 5 ml d'alcool à 95 % vol.

3.3 Perte à la dessiccation

Dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre avec couvercle, placer 2g d'albumine d'œuf. Dessécher à l'étuve à 100-105°C durant 6 heures. Laisser refroidir en capsule ouverte dans un dessiccateur. Peser. Soit **p** la quantité de résidu sec ; la perte de poids ne doit pas dépasser 10 p. 100

Dans le cas d'albumine d'œuf frais, l'extrait sec réel doit être supérieur à 10,5%.

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

3.4 Cendres

Incinérer le résidu sec de l'essai 3.4 en le chauffant progressivement à 600°C au four à moufle après avoir saupoudré l'albumine d'œuf de 0,2 à 0,3 g de paraffine sans cendres pour éviter le débordement de la masse.

Le taux de cendres ne doit être supérieur à 6,5 p. 100

3.5 Azote total

Déterminé selon la méthode décrite en annexe, la teneur en azote total doit être supérieure à 12 p. 100.

4 ESSAIS

4.1 Préparation de la solution pour essais

Après la pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau. Chauffer pour activer la dissolution et ajouter de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume égal à 25 fois le poids de l'albumine d'œuf sèche.

1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0, 04 g de l'albumine d'œuf sèche

4.2 Métaux lourds

A 10 ml de la solution préparée pour essais (4.1), ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5(R) et 1,2 ml de réactif au thioacétamide(R). Aucun précipité ne doit se produire. Si une coloration apparaît, elle doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en métaux lourds exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

4.3 Arsenic

A partir de la solution préparée pour essais (4.1), doser l'arsenic selon la méthode figurant en annexe. Teneur inférieure à 3 mg/kg.

4.4 Plomb

A partir de la solution préparée pour essais (4.1), doser le plomb selon la méthode figurant au Recueil. (Teneur inférieure à 5 mg/kg).

4.5 Mercure

A partir de la solution préparée pour essais (4.1), doser le mercure selon la méthode figurant en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg)

5 CONSERVATION

L'albumine d'œuf doit être conservée dans des emballages assurant une protection efficace contre l'humidité et les contaminations extérieures dans des locaux tempérés.

MEMBRANES D'ELECTRODIALYSE

(Oeno 29/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La membrane d'électrodialyse est une paroi mince, dense et insoluble constituée d'un matériau polymère perméable aux ions qui, disposée entre deux solutions, permet un transfert sélectif d'ions d'une solution vers l'autre sous l'action d'un champ électrique.

Le couple de membrane mis en œuvre se compose d'une membrane cationique et d'une membrane anionique.

La membrane cationique est un polymère permettant le passage préférentiel des cations, en particulier des cations : K^+, Ca^{++}.

La membrane anionique est un polymère permettant le passage préférentiel des anions, en particulier des anions tartrates.

Les membranes d'électrolyse sont employées pour la stabilisation du vin vis-à-vis des précipitations tartriques.

2. COMPOSITION

La membrane échangeuse de cations qui peut être utilisée est un copolymère styrène - divinylbenzène portant des groupes fonctionnels sulfoniques.

La membrane échangeuse d'anions qui peut être utilisée est

- soit un copolymère styrène - divinylbenzène portant des groupes fonctionnels ammonium quaternaire,

- soit un copolymère divinylbenzène - ammonium quaternaire.

Les membranes d'électrodialyse utilisées pour la stabilisation tartrique du vin doivent satisfaire aux conditions suivantes

2.1 - Elles doivent être fabriquées selon les bonnes pratiques de fabrication à partir des substances énumérées

2.1.1 - dans l'annexe 1 relative aux matériaux au contact des denrées

alimentaires.

2.1.2 - dans les annexes 2 et 3 relatives aux résines échangeuses d'ions utilisées dans le traitement des denrées alimentaires.

2.2 Elles doivent être préparées en vue de leur utilisation, conformément aux instructions du fabricant ou du fournisseur.

2.3 Elles ne doivent libérer aucune substance en quantité entraînant un danger pour la santé humaine ou nuisant au goût ou à l'odeur des denrées alimentaires.

2.4 Lors de leur utilisation, il ne doit pas exister d'interactions entre les constituants de la membrane et ceux du vin, susceptibles d'entraîner la formation dans le produit traité de nouveaux composés pouvant avoir des conséquences toxicologiques.

La stabilité des membranes d'électrodialyse neuves sera établie sur un simulateur reprenant la composition physico-chimique du vin pour l'étude de migration éventuelle de certaines substances issues de membranes d'électrodialyse.

La méthode d'expérimentation proposée est la suivante :

- Composition du simulateur :

Il s'agit d'une solution hydro-alcoolique tamponnée au pH et à la conductivité du vin. Sa composition est la suivante :

- Ethanol absolu : 11 litres.
- Hydrogénotartrate de potassium : 380 g.
- Chlorure de potassium : 60 g.
- Acide sulfurique concentré : 5 ml.
- Eau distillée : q.s.p. 100 litres.

Cette solution est utilisée pour les essais de migration en circuit fermé sur un empilement d'électrodialyse sous tension (1 volt/cellule), à raison de 50 litres/m^2 de membranes anioniques et cationiques, jusqu'à déminéraliser la solution de 50 %. Le circuit effluent est initié par une solution de chlorure de potassium à 5 g/l.

Les substances migrantes sont recherchées dans le simulateur ainsi que dans l'effluent d'électrodialyse.

Les molécules organiques qui rentrent dans la composition de la membrane et qui sont susceptibles de migrer dans la solution traitée seront dosées.

Un dosage particulier sera réalisé pour chacun de ces constituants par un laboratoire agréé. La teneur dans le simulateur doit être inférieure au total, pour l'ensemble des composés dosés à 50 µg/l.

De manière générale, les règles de contrôle des matériaux au contact des aliments doivent s'appliquer au cas de ces membranes.

3. LIMITES D'UTILISATION

Le couple de membrane applicable au traitement de la stabilisation tartrique du vin par électrodialyse est défini de telle sorte que

- la diminution du pH du vin ne soit pas supérieure à 0,3 unité pH;

- la diminution d'acidité volatile soit inférieure à 0,12 g/l (2 meq. exprimée en acide acétique) ;

- le traitement par électrodialyse n'affecte pas les constituants non ioniques du vin, en particulier les polyphénols et les polysaccharides;

- la diffusion de petites molécules telles que l'éthanol soit réduite et n'entraîne pas une diminution du titre alcoométrique du vin supérieure à 0,1 % vol.

4. CONDITIONS D'UTILISATION

La conservation et le nettoyage de ces membranes devront être effectués selon les techniques admises, avec des substances dont l'utilisation est autorisée pour la préparation des denrées alimentaires.

Annexe 1

Liste des monomères et autres substances de départ qui peuvent être utilisés pour la fabrication des matériaux et objets en matière plastique destinés à être mis au contact des denrées, produits et boissons alimentaires.

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES

N° PM/REF	N° CAS	DÉNOMINATION	RESTRICTIONS
(1)	(2)	(3)	(4)
10030	000514-10-3	Acide abiétique	
10060	000075-07-0	Acétaldéhyde	
10090	000064-19-7	Acide acétique	
10120	000108-05-4	Acétate de vinyle	LMS = 12 mg/kg
10150	000108-24-7	Anhydride acétique	
10210	000074-86-2	Acétylène	
10630	000079-06-1	Acrylamide	LMS = ND (LD = 0,01 mg/kg)
10660	015214-89-8	Acide 2-acrylamido-2-méthylpropane-sulfonique	LMS = 0,05 mg/kg
10690	000079-10-7	Acide acrylique	
10750	002495-35-4	Acrylate de benzyle	
10780	000141-32-2	Acrylate de n-butyle	
10810	002998-08-5	Acrylate de sec-butyle	
10840	001663-39-4	Acrylate de tert-butyle	
11470	000140-88-5	Acrylate d'éthyle	
	000818-61-1	Acrylate d'hydroxyéthyle	Voir "Monoacrylate d'éthylèneglycol"
11590	00106-63-8	Acrylate d'isobutyle	
11680	000689-12-3	Acrylate d'isopropyle	
11710	000096-33-3	Acrylate de méthyle	
11830	000818-61-1	Monoacrylate d'éthylèneglycol	
11890	002499-59-4	Acrylate de n-octyle	
11980	000925-60-0	Acrylate de propyle	

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Suite)

12100	000107-13-1	Acrylonitrile	LMS = non décelable (LD = 0,020 mg/kg, tolérance analytique comprise)
12310		Albumine	
12340		Albumine coagulée par le formaldéhyde	
12375		Monoalcools aliphatiques saturés, linéaires, primaires (C4-C22)	
12670	002855-13-2	1-Amino-3-aminométhyl-3,5,5-triméthylcyclohexane	LMS = 6 mg/kg
12788	002432-99-7	Acide 11-aminoundécanoïque	LMS = 5 mg/kg
12789	007664-41-7	Ammoniac	
12820	000123-99-9	Acide azélaïque	
12970	004196-95-6	Anhydride azélaïque	
13000	001477-55-0	1,3-Benzènediméthanamine	LMS = 0,05 mg/kg
13090	000065-85-0	Acide benzoïque	
13150	000100-51-6	Alcool benzylique	
	000111-46-6	Éther bis(2-hydroxyéthylique)	Voir "Diéthylèneglycol"
	000077-99-6	2,2-Bis(hydroxyméthyl)-1-butanol	Voir "1,1,1-Triméthylolpropane"
13390	000105-08-8	1,4-Bis(hydroxyméthyl)cyclohexane	
13480	000080-05-7	2,2-Bis(4-hydroxyphényl)propane	LMS = 3 mg/kg
13510	001675-54-3	Éther bis(2,3-époxypropylique) du 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane	QM = 1 mg/kg de PF ou LMS = non décelable (LD = 0,020 mg/kg, tolérance analytique comprise)
	000110-98-5	Éther bis(hydroxypropylique)	Voir "Dipropylèneglycol"
	005124-30-1	Bis(4-isocyanatocyclohexyl)méthane	Voir "4,4'-Diisocyanate dedicyclohexylméthane
13530	038103-06-9	Bis (anhydride phtalique) du 2,2-bis(4-hydroxyphényl) propane	LMS = 0,05 mg/kg
13600	047465-97-4	3,3-Bis(3-méthyl-4-hydroxyphényl)-2-indolinone	LMS = 1,8 mg/kg
	000080-05-7	Bisphénol A	Voir "2,2-Bis(4-hydroxyphényl) propane"
	001675-54-3	Éther bis(2,3-époxypropylique) du bisphénol A	Voir "Éther bis(2,3-époxypropylique) du 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane"
13614	038103-06-9	Bis(anhydride phtalique) du bisphénol	Voir 13530

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Suite)

13630	000106-99-0	Butadiène	QM = 1 mg/kg de PF ou LMS = non décelab (LD = 0,02 mg/kg, tolérance analytique com
13690	000107-88-0	1,3-Butanediol	
13840	000071-36-3	1-Butanol	
13870	000106-98-9	1-Butène	
13900	000107-01-7	2-Butène	
14110	000123-72-8	Butyraldéhyde	
14140	000107-92-6	Acide butyrique	
14170	000106-31-0	Anhydride butyrique	
14200	000105-60-2	Caprolactame	LMS(T) = 15 mg/kg
14230	002123-24-2	Caprolactame, sel de sodium	LMS(T) = 15 mg/kg (exprimé en caprolactan
14320	000124-07-2	Acide caprylique	
14350	000630-08-0	Monoxyde de carbone	
14380	000075-44-5	Chlorure de carbonyle	QM = 1 mg/kg de PF
14411	008001-79-4	Huile de ricin	
14500	009004-34-6	Cellulose	
14530	007782-50-5	Chlore	
	000106-89-8	1-Chloro-2,3-époxypropane	Voir "Épichlorhydrine"
14680	000077-92-9	Acide citrique	
14710	000108-39-4	*m*-Crésol	
14740	000095-48-7	*o*-Crésol	
14770	00106-44-5	*p*-Crésol	
	000105-08-8	1,4-Cyclohexanediméthanol	Voir "1,4-Bis(hydroxyméthyl)cyclohexane"
14950	003173-53-3	Isocyanate de cyclohexyle	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
15070	001647-16-1	1,9-Décadiène	LMS = 0,05 mg/kg
15095	000334-48-5	Acide décanoïque	
15100	000112-30-1	1-Décanol	

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Suite)

	000107-15-3	1,2-Diaminoéthane	Voir "Ethylènediamine"
	000124-09-4	1,6-Diaminohexane	Voir "Hexaméthylènediamine"
15250	000110-60-1	1,4-Diaminobutane	
15565	000106-46-7	1,4-Dichlorobenzène	LMS = 12 mg/kg
15700	005124-30-1	4,4'-Diisocyanate de icyclohexylméthane	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
15760	000111-46-6	Diéthylèneglycol	LMS(T) = 30 mg/kg seul ou avec l'éthylènegl
15790	000111-40-0	Diéthylènetriamine	LMS = 5 mg/kg
15820	000345-92-6	4,4'-Difluorobenzophénone	LMS = 0,05 mg/kg
15880	000120-80-9	1,2-Dihydroxybenzène	LMS = 6 mg/kg
15910	000108-46-3	1,3-Dihydroxybenzène	LMS = 2,4 mg/kg
15940	000123-31-9	1,4-Dihydroxybenzène	LMS = 0,6 mg/kg
15970	000611-99-4	4,4'-Dihydroxybenzophénone	LMS = 6 mg/kg
16000	000092-88-6	4,4'-Dihydroxydiphényle	LMS = 6 mg/kg
16150	000108-01-0	Diméthylaminoéthanol	LMS = 18 mg/kg
16240	000091-97-4	4,4'-Diisocyanate de 3,3'-diméthylbiphényle	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
16480	000126-58-9	Dipentaérythritol	
16570	004128-73-8	4,4'-Diisocyanate de l'éther diphénylique	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
16600	005873-54-1	2,4'-Diisocyanate de diphénylméthane	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
16630	000101-68-8	4,4'-Diisocyanate de diphénylméthane	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
16660	000110-98-5	Dipropylèneglycol	
16750	000106-89-8	Epichlorhydrine	QM = 1 mg/kg de PF
16780	000064-17-5	Éthanol	
16950	000074-85-1	Éthylène	
16960	000107-15-3	Éthylènediamine	LMS = 12 mg/kg
16990	000107-21-1	Éthylèneglycol	LMS(T) = 30 mg/kg seul ou avec le diéthylèneglycol

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Suite)

17005	000151-56-4	Éthylèneimine.	LMS = ND (LD = 0,01 mg/kg)
17020	000075-21-8	Oxyde d'éthylène	QM = 1 mg/kg de PF
17050	000104-76-7	2-Éthyl-1-hexanol	LMS = 30 mg/kg
17160	000097-53-0	Eugénol	LMS = 0,01 mg/kg
17170	061788-47-4	Acides gras de coco	
17200	068308-53-2	Acides gras de l'huile de soja	
17230	061790-12-3	Acides gras de tallol	
17260	000050-00-0	Formaldéhyde	LMS = 15 mg/kg
17290	000110-17-8	Acide fumarique	
17530	000050-99-7	Glucose	
18010	000110-94-1	Acide glutarique	
18070	000108-55-4	Anhydride glutarique	
18100	000056-81-5	Glycérol	
18250	000115-28-6	Acide hexachloroendométhylènetétra-hydrophtalique	LMS = ND (LD = 0,01 mg/kg)
18280	000115-27-5	Anhydride hexachloroendométhylènetétra-hydrophtalique	LMS = ND (LD = 0,01 mg/kg)
18310	036653-82-4	1-Hexadécanol	
18430	000116-15-4	Hexafluoropropylène	LMS = ND (LD = 0,01 mg/kg)
18460	000124-09-4	Hexaméthylènediamine	LMS = 2,4 mg/kg
18640	000822-06-0	Diisocyanate d'hexaméthylène	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
18670	000100-97-0	Hexaméthylènetétramine	LMS (T) = 15 mg/kg (exprimé en formaldéhyde)
	000123-31-9	Hydroquinone	Voir "1,4-Dihydroxybenzène"
18880	000099-96-7	Acide p-hydroxybenzoïque	
19000	000115-11-7	Isobutène	
19210	001459-93-4	Isophtalate de diméthyle	LMS = 0,05 mg/kg
19270	000097-65-4	Acide itaconique	
19460	000050-21-5	Acide lactique	

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Suite)

19470	000143-07-7	Acide laurique	
19480	002146-71-6	Laurate de vinyle	
19510	011132-73-3	Lignocellulose	
19540	000110-16-7	Acide maléique	LMS(T) = 30 mg/kg
19960	000108-31-6	Anhydride maléique	LMS(T) = 30 mg/kg (exprimé en acide maléic
	000108-78-1	Mélamine	Voir "2,4,6-Triamino-1,3,5-triazine"
20020	000079-41-4	Acide méthacrylique	
20080	002495-37-6	Méthacrylate de benzyle	
20110	000097-88-1	Méthacrylate de butyle	
20140	002998-18-7	Méthacrylate de sec-butyle	
20170	000585-07-9	Méthacrylate de tert-butyle	
20890	000097-63-2	Méthacrylate d'éthyle	
21010	000097-86-9	Méthacrylate d'isobutyle	
21100	004655-34-9	Méthacrylate d'isopropyle	
21130	000080-62-6	Méthacrylate de méthyle	
21190	000868-77-9	Monométhacrylate d'éthylèneglycol	
21280	002177-70-0	Méthacrylate de phényle	
21340	002210-28-8	Méthacrylate de propyle	
21460	000760-93-0	Anhydride méthacrylique	
21490	000126-98-7	Méthacrylonitrile	LMS = non décelable (LD = 0,020 mg/kg, tolérance analytique comprise)
21550	000067-56-1	Méthanol	
21940	000924-42-5	N-Méthylolacrylamide	LMS = ND (LD = 0,01 mg/kg)
22150	000691-37-2	4-Méthyl-1-pentène	LMS = 0,02 mg/kg
22350	000544-63-8	Acide myristique	
22390	000840-65-3	2,6-Naphtalènedicarboxylate de diméthyle	LMS = 0,05 mg/kg
22420	003173-72-6	1,5-Diisocyanate de napthalène	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Suite)

22450	009004-70-0	Nitrocellulose	
22480	000143-08-8	1-Nonanol	
22570	000112-96-9	Isocyanate d'octadécyle	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
22600	000111-87-5	1-Octanol	
22660	000111-66-0	1-Octène	LMS = 15 mg/kg
22763	000112-80-1	Acide oléique	
22780	000057-10-3	Acide palmitique	
22840	000115-77-5	Pentaérythritol	
22870	000071-41-0	1-Pentanol	
22960	000108-95-2	Phénol	
23050	000108-45-2	1,3-Phénylènediamine	QM = 1 mg/kg de PF
	000075-44-5	Phosgène	Voir "Chlorure de carbonyle"
23170	007664-38-2	Acide phosphorique	
		Acide phtalique	Voir "Acide téréphtalique"
23200	000088-99-3	Acide *o*-phtalique	
23230	000131-17-9	Phtalate de diallyle	LMS = ND (LD = 0,01 mg/kg)
23380	000085-44-9	Anhydride phtalique	
23470	000080-56-8	alpha-Pinène	
23500	000127-91-3	bêta-Pinène	
23590	025322-68-3	Polyéthylèneglycol	
23651	025322-69-4	Polypropylèneglycol	
23740	000057-55-6	1,2-Propanediol	
23800	000071-23-8	1-Propanol	
23830	000067-63-0	2-Propanol	
23860	000123-38-6	Propionaldéhyde	
23890	000079-09-4	Acide propionique	

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Suite)

23950	000123-62-6	Anhydride propionique	
23980	000115-07-1	Propylène	
24010	000075-56-9	Oxyde de propylène	QM = 1 mg/kg de PF
	000120-80-9	Pyrocatéchol	Voir "1,2-Dihydroxybenzène"
24057	000089-32-7	Anhydride pyromellitique	LMS = 0,05 mg/kg (exprimé en acide pyromellitique)
24070	073138-82-6	Acides résiniques	
	000108-46-3	Résorcinol	Voir "1,3-Dihydroxybenzène"
24100	008050-09-7	Colophane	
24130	008050-09-7	Gomme de colophane	Voir "colophane"
24160	008052-10-6	Résine de tallol	
24190	009014-63-5	Résine de bois	
24250	009006-04-6	Caoutchouc naturel	
24270	000069-72-7	Acide salicylique	
24280	000111-20-6	Acide sébacique	
24430	002561-88-8	Anhydride sébacique	
24475	001313-82-2	Sulfure de sodium	
24490	000050-70-4	Sorbitol	
24520	008001-22-7	Huile de soja	
24540	009005-25-8	Amidon alimentaire	
24550	000057-11-4	Acide stéarique	
24610	000100-42-5	Styrène	
24820	000110-15-6	Acide succinique	
24850	000108-30-5	Anhydride succinique	
24880	000057-50-1	Saccharose	
24887	006362-79-4	Acide 5-sulfoisophtalique, sel mono-sodique	LMS = 5 mg/kg
24888	003965-55-7	5-Sulfoisophtalate de diméthyle, sel monosodique	LMS = 0,05 mg/kg

LISTE DES MONOMERES ET AUTRES SUBSTANCES DE DEPART AUTORISES (Fin)

24910	000100-21-0	Acide téréphtalique	LMS = 7,5 mg/kg
24940	000100-20-9	Dichlorure de l'acide téréphtalique	LMS(T) = 7,5 mg/kg (exprimé en acide téréphtalique)
24970	000120-61-6	Téréphtalate de diméthyle	
25090	000112-60-7	Tétraéthylèneglycol	
25120	000116-14-3	Tétrafluoroéthylène	LMS = 0,05 mg/kg
25150	000109-99-9	Tétrahydrofuranne	LMS = 0,6 mg/kg
25180	000102-60-3	N,N,N',N'-Tétrakis(2-hydroxypropyl)-éthylènediamine	
25210	000584-84-9	2,4-Diisocyanate de toluène	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
25240	000091-08-7	2,6-Diisocyanate de toluène	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
25270	026747-90-0	2,4-Diisocyanate de toluène, dimère	QM(T) = 1 mg/kg de PF (exprimé en NCO)
25360		Trialkyl(C_5-C_{15})acétate de 2,3-époxypropyle	LMS = 6 mg/kg
25420	000108-78-1	2,4,6-Triamino-1,3,5-triazine	LMS = 30 mg/kg
25510	000112-27-6	Triéthylèneglycol	
25600	000077-99-6	1,1,1-Triméthylolpropane	LMS = 6 mg/kg
25910	024800-44-0	Tripropylèneglycol	
25960	000057-13-6	Urée	
26050	000075-01-4	Chlorure de vinyle	Voir la directive 78/142/CEE du Conseil
26110	000075-35-4	Chlorure de vinylidène	QM = 5 mg/kg de PF ou LMS = non décelable (LD = 0,05 mg/kg)
26140	000075-38-7	Fluorure de vinylidène	LMS = 5 mg/kg

8 Un certain nombre d'abréviations ou d'expressions figurent à la colonne 4 du tableau. Leur signification est la suivante:

LD = limite de détection de la méthode d'analyse,

PF = matériau ou objet fini,

NCO = groupement isocyanate,

ND = non décelable.
Aux fins de la présente directive, "non décelable" signifie que la substance ne devrait pas être détectée par une méthode d'analyse validée qui pourrait la détecter à la limite de détection spécifiée. Si une telle méthode n'existe pas actuellement, une méthode d'analyse avec des caractéristiques de performance appropriées à la limite spécifiée peut être utilisée en attendant le développement d'une méthode validée. "

QM = quantité maximale permise de substance "résiduelle" dans le matériau ou objet,

QM (T) = quantité maximale permise de substance "résiduelle" dans le matériau ou l'objet exprimée comme le total du groupement ou de la (des) substance(s) indiquée(s).
Aux fins de la présente directive, "QM (T)" signifie que la quantité maximale permise de la substance "résiduelle" dans le matériau ou l'objet devrait être déterminée par une méthode d'analyse validée à la limite spécifiée. Si une telle méthode n'existe pas actuellement, une méthode d'analyse avec des caractéristiques de performances appropriées à la limite spécifiée peut être utilisée en attendant le développement d'une méthode validée.

LMS = limite de migration spécifique dans la denrée alimentaire ou dans le simulant alimentaire, à moins qu'elle ne soit précisée différemment.
Aux fins de la présente directive, "LMS" signifie que la migration spécifique de la substance devrait être déterminée par une méthode d'analyse validée à la limite spécifiée. Si une telle méthode n'existe pas actuellement, une méthode d'analyse avec des caractéristiques de performances appropriées à la limite spécifiée peut être utilisée en attendant le développement d'une méthode validée.

LMS (T) = limite de migration spécifique dans la denrée alimentaire ou dans le simulant alimentaire exprimée comme le total du groupement ou de la (des) substance(s) indiquée(s).
Aux fins de la présente directive, "LMS (T)" signifie que la migration spécifique de la substance devrait être déterminée par une méthode d'analyse validée à la limite spécifiée. Si une telle méthode n'existe pas actuellement, une méthode d'analyse avec des caractéristiques de performances appropriées à la limite spécifiée peut être utilisée en attendant le développement d'une méthode validée.

Annexe 2

Liste d'inventaire des substances utilisées dans la fabrication des résines échangeuses d'ions et adsorbantes servant au conditionnement des denrées alimentaires.

(Résolution AP (97)1 CE)

Liste 1

Substances évaluées par un organisme international

NOM	PM/REF	CAS	RESTRICTIONS
Monomères et autres substances de départ			
Acrylate de n-butyle	10780	00141-32-2	-
Acrylate d'éthyle	11470	00140-88-5	-
Acrylate de méthyle	11710	00096-33-3	-
Acrylonitrile	12100	00107-13-1	LMS = non décelable (LD = 0,02 mg/kg)
Formaldéhyde	17260	00050-00-0	LMS = 15 mg/kg
Méthacrylate de méthyle	21130	00080-62-6	-
Méthanol	21550	00067-56-1	-
Styrène	24610	00100-42-5	-
Modificateurs chimiques			
Acide carbonique, sels	42500	-	-
Acide chlorhydrique	59990	07647-01-0	-
Acide phosphorique	72640	07664-38-2	-
Acide silicique, sels	85980	-	-
Acide sulfurique	91920	07664-93-9	-
Anhydride acétique	10150	00108-24-7	-
tert-Butyl-4-hydroxyanisole (=BHA)	40720	25013-16-5	LMS = 30 mg/kg
Diéthylènetriamine	15790	00111-40-0	LMS = 5 mg/kg
Diméthylamine	49225	00124-40-3	LMS = 0,06 mg/kg
2-(Diméthylamino)éthanol	49235	00108-01-0	LMS = 18 mg/kg
Formaldéhyde	54880	00050-00-0	LMS = 15 mg/kg
Hexaméthylènediamine	18460	00124-09-4	LMS = 2,4 mg/kg
Hydroxyde de potassium	81600	01310-58-3	-
Hydroxyde de sodium	86720	01310-73-2	-
Nitrite de sodium	86920	07632-00-0	LMS = 0,6 mg/kg
Oxyde d'éthylène	17020	00075-21-8	QM = 1 mg/kg de PF

2-Propanol	81882	00067-63-0	-
Adjuvants de polymérisation			
Acides alkylsulfoniques (C_8-C_{22})		34230	LMS = 6 mg/kg
Acides alkylsulfurique~(C_8-C_{22}), linéaires, primaires, à nombre pair d'atomes de carbone		34281	-
Acide formique	55040	00064-18-6	-
Carboxyméthylcellulose	42640	09000-11-7	-
Chlorure d'étain (IV)	93420	07646-78-8	-
Chlorure de méthylène	66620	00075-09-2	LMS = 0,05 mg/kg
1,4-Dihydroxybenzène	48620	00123-31-9	LMS = 0,6 mg/kg
Gélatine	55440	09000-70-8	-
Hydroxyde d'ammonium	35600	01336-21-6	-
Hydroxyde de magnésium	64640	01309-42-8	-
Hydroxyéthylcellulose	60560	09004-62-0	-
Hydroxéthylméthylcellulose	60880	09032-42-2	-
Méthanol	65960	00067-56-1	-
Méthylcarboxyméthylcellulose	66200	37206-01-2	-
Méthylisobutylcétone	66725	00108-10-1	LMS = 5 mg/kg
Toluène	93540	00108-88-3	LMS = 1,2 mg/kg

==========

Annexe 3

Substances provisoirement utilisables dans la fabrication des résines échangeuses d'ions.

Liste 2

1. Substances non évaluées complètement par un organisme international

NOM	PMEF	CAS	RESTRICTIONS
Monomères et autres substances de départ			
Diméthacrylate d'éthylèneglycol	20440	00097-90-5	-
Divinylbenzène	16690	01321-74-0	-
Ether diallylique du 1, 1, 1 -triméthylolpropane	25645	00682-09-7	-
Méthacrylate de 2,3-époxypropyle	20590	00106-91-2	-
2-Méthyl- 1,3-butadiène	21640	00078-79-5	-
1,7-Octadiène	22585	03710-30-3	-
Triméthacrylate du 1, 1, 1 -triméthylolpropane	25840	03290-92-4	
Modificateurs chimiques			
N,N-Diméthyl- 1,3-diaminopropane	49380	00109-55-7	
Triéthylamine	94270	00121-44-8	-
Triéthylènetétramine	25520	00112-24-3	-
Adjuvants de polymérisation			
Alcools polyvinyliques	81280	09002-89-5	-
4-tert-Butylcatéchol	40640	00098-29-3	-
Diisobutylcétone	49050	00108-83-8	-
Hypochlorite de sodium	62110	07681-52-9	-
Isobutanol	62270	00078-83-1	-
4-Méthoxyphénol	66030	00150-76-5	-
Méthylène bis (naphtalènesulfonate de sodium)	66600	26545-58-4	-
4-Méthyl-2-pentanol	66860	00108-11-2	-
Peroxyde de dibenzoyle	46440	00094-36-0	-
Polyacétate de vinyle partiellement hydrolysé	81260	-	-

2. *Substances non évaluées par un organisme international*

NOM	PM/REF	CAS	RESTRICTIONS
Monomères et autres substances de départ			
Diméthoxyméthane	-	00109-87-5	-
Ether divinylique du diéthylèneglycol	-	00764-99-8	-
Ethylvinylbenzène	-	28106-30-1	-
1,2,4-Trivinyleyclohexane	-	02855-27-8	-
Modificateurs chimiques			
Acide chlorosulfonique	-	07790-94-5	-
Acide monochloroacétique	-	00079-11-8	-
Acide phosphoreux	-	13598-36-2	-
Brome	-	07726-95-6	-
2-Chloroéthanol	-	00107-07-3	-
Chlorure de méthyle	-	00074-87-3	-
1,2-Dichloroéthane	-	00107-06-2	-
1,2-Dichloropropane	-	00078-87-5	-
3-(Diméthylamino)propanol	-	03179-63-3	-
Ether chlorométhyl-méthylique	-	00107-30-2	-
Nitrobenzène	-	00098-95-3	-
Nitrite de potassium	-	07758-09-0	-
Phthalimide	-	00085-41-6	-
Trioxyde de soufre	-	07446-11-9	-
Triméthylamine	-	00075-50-3	-

*2. Substances non **évaluées par** un organisme international*

NOM	PM/REF	CAS	RESTRICTIONS
Adjuvants de polymérisation			
Acide lignosulfonique	63940	08062-15-5	-
Acide peracétique	-	00079-21-0	-
Acide polyacrylique	76460	09003-01-4	-
Acide poly(styrènesulfonique), sel de sodium	-	09080-79-9	-
Acrylamide - acide acrylique, copolymère	-	09003-06-9	-
tert-Alkylamines (C,2-CI4), ethoxylées, propoxylées		-68603-58-7	-
Anhidryde maléique-styrène, copolymère, sel d'ammonium	-	26022-09-3	-
Attapulgite	-	12174-11-7	-
Azobisisobutyronitrile	-	00078-67-1	-
1J Bis (tert-butylperoxy)-3,3,5-triméthylcyclohexane	-	06731-36-8	-
n-Dodécyl mercaptan	-	00112-55-0	-
tert-Dodécyl mercaptan	-	25103-58-6	-
Ether monobutylique du poly(éthylène/propylene) glycol	-	-09038-95-3	
Ether octylphénylique du polyéthylèneglycol	78560	09002-93-1	-
Ether du poly(éthylène/propylène)glycol avec le 1, 1, 1 -triméthylolpropane	-	52624-57-4	-
tert-Hexadécyl mercaptan	-	25360-09-2	-
Hydropéroxyde de cumyle	-	00080-15-9	-
Isododécane	62405	31807-55-3	-
Isooctane	-	26635-64-3	-
Mono- et dialkyl (C_{IO}-C_{18}) sulfonamides	-	-	
Nitrate d'argent	-	07761-88-8	-
n-Octane	-	00111-65-9	-
Peracétate de tert-butyle	-	00107-71-1	-
Perbenzoate de tert-butyle	-	00614-45-9	-
Percarbonate de bis (4-tert-butylcyclohexyte)	-	15520-11-3	-
Per(2-éthylhexanoate) de tert-butyle	-	03006-82-4	-
Peroctanoate de tert-butyle	-	134,67-82-8	-
Peroxyde de dilauroyle	-	00105-74-8	-
Poly(chlorure de diallyldiméthylammonium)	-	26062-79-3	-
Polyvinylpyrrolidone	81500	09003-39-8	-

MEMBRANES BIPOLAIRES D'ELECTRODIALYSE (OIV-OENO 411-2011)

1. Objet, origine et domaine d'application

La membrane bipolaire est une paroi mince, dense et insoluble constituée d'un matériau polymère fonctionnalisé par des groupements ioniques. Une membrane bipolaire possède une face anionique et une face cationique, elle est équivalente à l'association d'une membrane cationique et d'une membrane anionique en une seule et même membrane ; Les membranes cationiques et anioniques sont définies au Codex Oenologique International (Membranes d'électrodialyse oeno 29/2000)

Le couple de membranes mis en œuvre dans la technique d'acidification par électrodialyse bipolaire se compose d'une membrane bipolaire et d'une membrane cationique. Cet agencement, dans un empilement d'un électrodialyseur, autorise seulement l'extraction des cations.

- La membrane cationique permet le passage préférentiel des cations en particulier le potassium.
- La membrane bipolaire a pour fonction de maintenir l'équilibre ionique acido-basique du système, à la suite de l'extraction d'une fraction du potassium du moût ou du vin.

2. Composition des membranes

2.1 Composition de la membrane cationique

Les membranes cationiques mises en œuvre dans la technique d'acidification par électrodialyse à membranes bipolaires doivent être conformes aux prescriptions décrites dans la monographie des membranes d'electrodialyse (Résolution Oeno 29/2000) figurant dans le Codex œnologique international.

2.2 Composition de la membrane bipolaire

La membrane bipolaire qui peut être utilisée est un copolymère styrène-divinylbenzène, dont la face cationique et la face anionique sont conformes à la composition des membranes cationiques et anioniques décrites dans le Codex Oenologique International (Membranes d'électrodialyse oeno 29/2000)

2.3 Elles doivent être fabriquées selon les bonnes pratiques de fabrication à partir des substances énumérées

2.3.1 dans l'annexe 1 de la monographie des membranes d'electrodialyse (Résolution Oeno 29/2000) relative aux matériaux au contact des denrées alimentaires.

2.3.2 dans les annexes 2 et 3 de la monographie des membranes d'electrodialyse (Résolution Oeno 29/2000) relatives aux résines échangeuses d'ions dans le traitement des denrées alimentaires.

2.4 Elles doivent être préparées en vue de leur utilisation conformément aux instructions du fabricant ou du fournisseur.

2.5 Elles ne doivent libérer aucune substance en quantité entraînant un danger pour la santé humaine ou nuisant au goût et à l'odeur des denrées alimentaires.

2.6 Lors de leur utilisation il ne doit pas exister d'interactions entre les constituants de la membrane et ceux du moût ou du vin, susceptibles d'entraîner la formation dans le produit traité de nouveaux composés pouvant avoir des conséquences toxicologiques.

3. Limites d'utilisation

La diffusion de petites molécules telles que l'éthanol doit être faible et ne pas entraîner une diminution du titre alcoométrique volumique supérieure à 0,1% vol.

4. Conditions d'utilisation

La conservation et le nettoyage des membranes doivent être effectués selon les techniques admises, avec des substances dont l'utilisation est autorisée pour la préparation des denrées alimentaires.

PREPARATIONS ENZYMATIQUES

(OIV-OENO 365-2009, OIV-OENO 485-2012)

Les prescriptions formulées ci-dessous concernent toutes les préparations enzymatiques susceptibles d'être utilisées au cours des diverses opérations que l'on peut appliquer aux raisins et à leurs dérivés.

Elles se basent sur les « General Specifications and Considerations for Enzymes used in Food Processing » émises par le "*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 67th Meeting, Rome 20 – 29 June* 2006 et publiées en 2006 dans les Monographies FAO JECFA.

1. GENERALITES

Les préparations enzymatiques peuvent être élaborées à partir de microorganismes ou de toute autre source biologique sûre.
Lorsqu'il s'agit de rechercher une synergie entre diverses activités enzymatiques telles que les pectinases, les cellulases et les hémicellulases, des mélanges de préparations issues de souches différentes peuvent être réalisés. Ces préparations peuvent contenir un ou plusieurs composants actifs, ainsi que des supports, des diluants, des agents conservateurs, des antioxydants ou d'autres substances compatibles avec les bonnes pratiques de fabrication et en accord avec la réglementation locale. Elles peuvent dans certains cas contenir des cellules ou des fragments de cellules. En outre, elles peuvent se présenter sous l'aspect liquide ou solide. Les substances actives peuvent également être immobilisées sur des supports admis pour des usages alimentaires.

2. ETIQUETAGE

L'étiquetage des préparations enzymatiques doit préciser au minimum le nom de l'enzyme, conformément aux règles dictées par l'IUBMB (ex. polygalacturonase), l'activité (en unités par g ou ml), le numéro de lot, les conditions de conservation pour le maintien de la stabilité et la date limite d'utilisation. Les préparations enzymatiques à effets technologiques multiples (cf. 4.1) doivent comporter le nom de chaque enzyme sur lesquelles la préparation a été standardisée.
Si la place à disposition le permet, il serait souhaitable que les informations complémentaires suivantes figurent également sur l'étiquette : dosage préconisé et conditions de mise en œuvre, nature des

additifs et des supports utilisés, nature des activités enzymatiques. Si la place fait défaut, ces informations seront alors indiquées sur la fiche technique de la préparation.

L'indication que les préparations enzymatiques ont été obtenues à partir d'organismes génétiquement modifiés doit être mentionnée. S'il n'en est pas fait mention sur l'étiquette, le fait d'avoir fait appel au génie génétique pour améliorer les microorganismes .produisant l'enzyme doit être mentionné dans la documentation liée.

3. PREPARATIONS ENZYMATIQUES ADMISES

Toutes les préparations enzymatiques contenant des activités présentant un intérêt technologique dûment prouvé dans la pratique et remplissant pleinement les conditions et les critères mentionnés ci-dessous, sont admises pour le traitement des raisins et de leurs dérivés.
Les préparations enzymatiques utilisées ne doivent contenir ni substance, ni micro-organisme ou activité enzymatique pouvant :

- être nuisible à la santé ;
- être nuisible à la qualité des produits élaborés, en particulier au niveau de la couleur, de l'arôme et du goût des vins ;
- conduire à la formation de produits indésirables ;
- occasionner ou faciliter une fraude.

4. ACTIVITES ENZYMATIQUES

4.1 Généralités

Les préparations enzymatiques contiennent souvent plusieurs activités enzymatiques. En dehors des activités enzymatiques principales (activité(s) sur laquelle - respectivement sur lesquelles - la préparation enzymatique est standardisée) dont l'intérêt et l'effet technologiques ont été dûment prouvés, des activités enzymatiques dites secondaires ne sont tolérées que dans les limites des contraintes technologiques de production des préparations enzymatiques.

De manière générale, les activités secondaires contenues dans une préparation donnée ne doivent pas devenir la raison principale motivant l'utilisation de ladite préparation, à moins qu'il ne s'agisse d'une préparation à effets technologiques multiples. En ce qui se réfère au Code International des Pratiques Œnologiques, Oeno

11/04, 18/04 et 3/85, différence est faite, au niveau technologique, entre les types de préparations suivantes à effet :

- macérant : facilitent l'extraction de composés tels que la couleur, les tanins, etc.
- clarifiant / filtrant : facilitent la clarification et la filtration des moûts et des vins
- révélateur d'arôme : renforce et/ou modifie le profil aromatique des moûts et des vins
- stabilisant : facilite l'extraction de macromolécules ou d'autres substances ayant un effet stabilisant sur les vins (ex. mannanes des levures).

Lorsqu'une préparation enzymatique génère des effets technologiques multiples, dûment constatés dans la pratique, (ex. enzymes clarifiantes et révélatrices d'arôme) qu'ils soient la résultante d'activités principales et/ou secondaires, elle doit être déclarée comme telle sur l'étiquette. Les différentes activités responsables de ces effets doivent être dosées et indiquées dans la fiche technique de la préparation.

4.2 Mesure des activités

Les activités enzymatiques présentes sont dosées dans les conditions qui correspondent à leurs caractéristiques biochimiques (pH, température) et si possible le plus proche de celles rencontrées dans la pratique (jus de raisin, moût ou vin). Les méthodes mises en œuvre doivent correspondre à l'état de l'art en matière analytique et, si possible, être validées selon des standards internationaux appropriés (par ex. ISO 78-2 ; ISO 5725).

Les résultats sont exprimés en nanokatal/g ou en nanokatal/ml, ou en unités de viscosité dans le cas d'enzymes présentant des activités de type « endo- ». (nkat = 1 nmole de substrat transformé par seconde par g ou ml de la préparation). Les résultats doivent être donnés en faisant référence à la méthode employée.

Dans le cas où l'effet technologique recherché résulterait de l'action de différentes enzymes au sein d'une même préparation, la mesure de chacune de ces activités enzymatiques est nécessaire. Chacune de ces activités fera l'objet d'une monographie spécifique au sein du Codex, où seront précisées les méthodes de mesure.

5. SOURCES D'ENZYMES ET MILIEUX DE FERMENTATION

Les sources d'enzymes doivent être non pathogènes, non toxinogènes et génétiquement stables. En outre, les milieux de fermentation ne doivent pas laisser de résidus nuisibles à la santé dans les préparations enzymatiques. Dans le cas des micro-organismes, une étude de sécurité doit être réalisée afin de s'assurer qu'une préparation enzymatique produite par une espèce donnée de micro-organisme (ex. *Aspergillus niger*) ne présente pas de risque pour la santé. Cette étude peut être effectuée en se basant sur les principes énoncés dans les lignes directrices pour les enzymes alimentaires publiées par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA/EFSA) ou d'autres organismes équivalents.
Les techniques mises en œuvre doivent être compatibles avec les bonnes pratiques de fabrication et les prescriptions du Codex œnologique international si des levures et/ou des bactéries lactiques sont utilisées.

6. SUPPORTS, DILUANTS, AGENTS CONSERVATEURS OU AUTRES ADDITIFS

Les substances utilisées comme supports, diluants, agents conservateurs ou autres additifs ne doivent pas, par effet « carry-over », diffuser dans les raisins et leurs produits dérivés des composés qui ne seraient pas compatibles avec la réglementation en vigueur dans les différents pays. Par ailleurs, ces composés ne doivent pas avoir d'incidence négative sur la qualité et les propriétés organoleptiques du vin.

Dans le cas d'enzymes immobilisées, les supports utilisés doivent répondre aux normes sur les matériaux entrant en contact avec les denrées alimentaires. Pour ce dernier type de préparation, la teneur des composants du support utilisé, susceptibles de passer dans le moût ou le vin, devra être déterminée et indiquée sur l'étiquette de la préparation enzymatique.

Des agents conservateurs tels que le KCl sont ajoutés dans le concentré liquide d'enzymes au cours de la fabrication. Ces substances permettent

d'éviter le développement de micro-organismes au cours des différentes opérations de formulation des produits. Elles se retrouvent dès lors non seulement dans les préparations liquides mais également dans les préparations solides. Compte tenu de l'inévitable effet « carry-over », seuls les agents conservateurs qui sont compatibles avec la réglementation en vigueur dans les différents pays sont autorisés. Ces

substances doivent être clairement identifiées et indiquées sur l'étiquette ou sur la fiche technique du produit commercial.

7. HYGIENE ET TENEURS LIMITES EN CONTAMINANTS

Les préparations enzymatiques doivent être produites en accord avec les bonnes pratiques de fabrication.

7.1 Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Teneur inférieure à 5 mg/kg.

7.2 Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Teneur inférieure à 0,5 mg/kg.

7.3 Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Teneur inférieure à 3 mg/kg.

7.4. Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Teneur inférieure à 0,5 mg/kg

7.5 Salmonelles sp

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

7.6 Coliformes totaux

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Teneur inférieure à 30 par gramme de préparation.

7.7 *Escherichia coli*

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.
Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

7.8 ACTIVITE ANTIMICROBIENNE :
non détectable.

7.9 MYCOTOXINES SPECIFIQUES AUX DIVERSES SOUCHES DE PRODUCTION :
non détectables.

8 . FICHE TECHNIQUE A FOURNIR OBLIGATOIREMENT PAR LE FABRICANT

Chaque sorte de préparation enzymatique doit être définie à l'aide d'une fiche technique.
Celle-ci doit contenir au minimum les informations suivantes :

- Nom de l'enzyme et origine biologique (par exemple enzyme pectolytique de Aspergillus niger ou enzyme pectolytique de A. oryzae exprimée dans A. niger);
- Activité déclarée (en nKat/g ou nKat/ml de préparation)

- Domaines et modalités d'application (effets technologiques attendus et détails utiles à la mise en oeuvre de la préparation);
- Stabilité de la préparation avec période limite d'utilisation à partir de la date de production, garantissant le maintien de l'activité, sous des conditions de stockage données (température, …)
- Types de réactions catalysées par les activités enzymatiques principales;
- Activités enzymatiques principales avec N° IUB (par exemple Tannase 3.1.1.20);
- Activités enzymatiques secondaires avec, si possible, le N° IUB
- Types de supports, de diluants, d'agents conservateurs ou d'additifs utilisés, ainsi que leurs teneurs ;

Si jugé utile, d'autres informations peuvent compléter cette fiche technique.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENDO-α(1,5) ARABINANASE DANS LES PREPARATIONS D'ENZYMES PECTOLYTIQUES

(OIV-Oeno 412-2012)

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes parmi d'autres activités, au sein d'un complexe enzymatique. Sauf stipulation contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365–2009 relative aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques figurant dans le Codex œnologique international.

1. Origine

Référence est faite au paragraphe 5 « Source d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées de microorganismes comme par exemple l''*Aspergillus niger*, *Aspergillus Tubigensis, Aspergillus Awamori Trichoderma reesei, Penicillium funiculosum*, ou les Arabinanases appartiennent à la famille des glycohydrolases.

2. Objet / Champ d'application

Référence est faite au Code International des Pratiques Œnologiques, Oeno 11/04; 12/04; 13/04; 14/04 and 15/04.

Les arabinanases sont utiles pour la macération des raisins, la clarification des moûts et des vins, la filtrabilité des moûts et des vins, car elles ont des propriétés facilitant l'action d'autres activités enzymatiques, par l'hydrolyse des constituants de la paroi cellulaire du raisin.

3. Principe

Le substrat utilisé est de l'arabinane débranché à liaisons croisées azurine (AZCL-Arabinane). L'arabinane hautement purifié extraite de pulpe de betterave sucrière est traitée avec de l'α-L-arabinofuranosidase afin d'éliminer les résidus d'arabinofuranosyle à liaison α-1,3 et α-1,2, conservant l'arabinane α-1,5 linéaire. Ce polysaccharide conserve un faible pourcentage d'acide galacturonique, galactose et rhamnose (6,4 et 2 % respectivement), mais résiste à l'attaque de la polygalacturonase et de l'endo-1,4-β-D-galactanase. Le polysaccharide est ensuite coloré et réticulé. Le traitement de ce substrat avec une quantité largement excessive de α-L-arabinofuranosidase entraîne une libération limitée d'arabinose mais aucune libération de fragments marqués par le colorant.
L'AZCL-Arabinane est un substrat très sensible et très spécifique pour l'analyse de l'endo-arabinanase, permettant de mesurer le surnageant à 590 nm après la réaction.

4. Appareillage

4.1. Tubes à essais en verre (15 mL)
4.2. Bain-d'eau réglé à 40 °C
4.3. Agitateur-mélangeur à Vortex
4.4. Filtre circulaire qualitatif retenant les particules de diamètre : 11µm (en solution liquide)
4.5. Cuvettes avec trajet optique de 1 cm
4.6. Spectrophotomètre réglé à 590 nm
4.7. Chronomètre
4.8. Pipette (500 µl, 10 mL)
4.9. pH-mètre
4.10. Tubes à essais en verre de 15 mL
4.11. Portoir métallique pour tubes à essais de 15 mL
4.12. Entonnoir
4.13. Fiole jaugée de 100 mL

5. Réactifs et produits :

5.1. Comprimés d'arabinazyme (Megazyme, lot 60701) par exemple
5.2. Base Trizma (CAS N°. 77-86-1)
5.3. Acide acétique glacial (CAS N°. 64-19-7)
5.4. Solution d'hydroxyde de sodium (CAS N°. 1310-73-2)

6. Solutions

6.1 Tampon de dilution
(Tampon d'acétate de sodium, 50 mM, pH 4,0)
De l'acide acétique glacial est versé dans 900 mL d'eau distillée. Cette solution est ajustée à pH 4,0 par ajout de solution d'hydroxyde de sodium 1 M. Le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillée.

6.2 Solution à 2 % de base Trizma
2 g de base Trizma sont dilués dans 100 mL d'eau distillée.

7. Préparation de l'échantillon

7.1 Dilution de l'enzyme
Pour la plupart des préparations commerciales de pectinases, une dilution 500 fois est nécessaire. Placer 200 mg de préparation commerciale dans une fiole jaugée de 100 mL, compléter avec le tampon de dilution (6.1), et agiter afin d'obtenir un mélange homogène.

8. Procédure

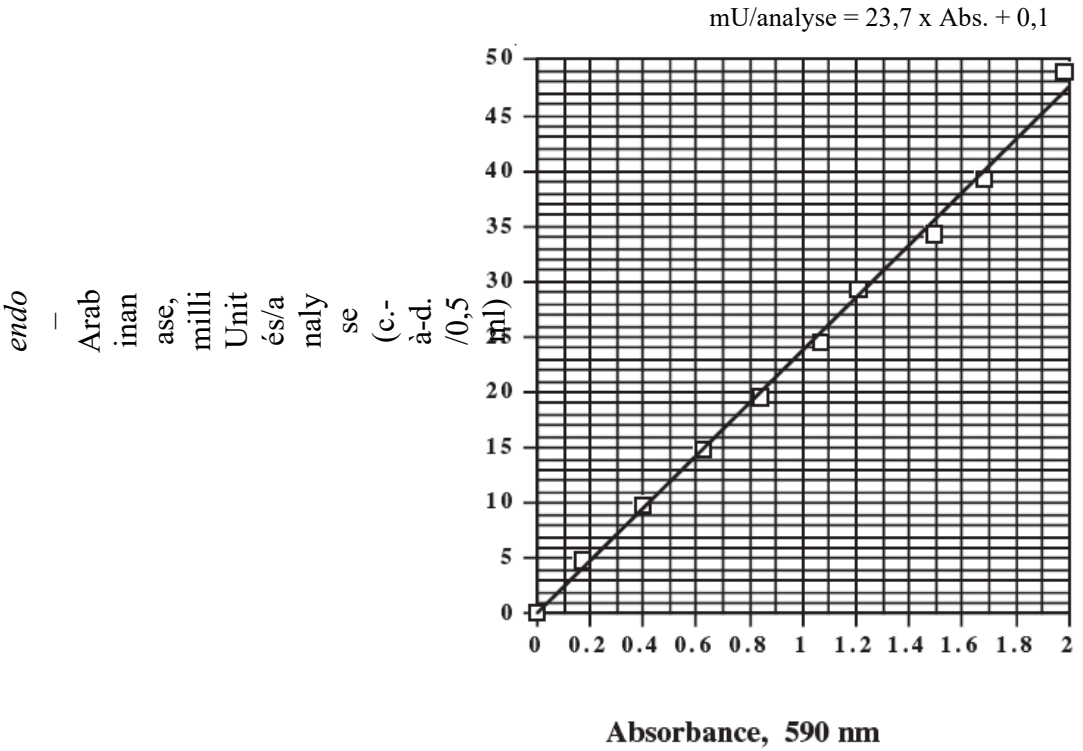
8.1 Réaction enzymatique
Préparer les tubes à essais au moins en double.
Diluer 500 µL d'enzyme dans le tampon de dilution (7.1) et pré-équilibrer à 40 °C pendant 5 mn.
Déclencher la réaction en ajoutant un comprimé d'arabinazyme. Démarrer le chronomètre.
Le comprimé s'hydrate rapidement. **Ne pas** agiter la suspension.
Après exactement 10 mn à 40 °C, mettre fin à la réaction en ajoutant 10 mL de solution de base Trizma (6.2) et agiter.
Laisser reposer approximativement 5 mn à température ambiante, puis agiter de nouveau la suspension épaisse et filtrer avec un filtre circulaire qualitatif.
Mesurer ensuite l'absorbance des solutions de réaction à 590 nm par rapport au blanc de réaction

8.2 Blanc de réaction

Préparer un blanc de réaction en versant 10 mL de solution de base Trizma (6.2) dans 500 µl de solution d'enzyme et agiter avant d'ajouter le comprimé d'arabinazyme.

9. Calculs

L'activité endo-arabinanase analysée est déterminée par rapport à la courbe d'étalonnage du kit d'essai (à savoir le Lot. No. 60701)



$$Y = MX + C * 2 * F_v / 1000 \quad \text{[U/g ou ml]}$$

Où :

Y activité endo-arabinase (en milliUnités/analyse)
M pente de la courbe d'étalonnage
X absorbance de la réaction à 590 nm (moins le blanc de réaction, ou lecture par rapport au blanc de réaction)
C intersection sur l'axe Y (ordonnée à l'origine)
2 conversion de 0,5 mL de dilution d'enzyme à 1 mL lors de l'essai
F_V facteur de dilution de la préparation enzymatique originale (c.-à-d. 500 fois)
1000 conversion de milliUnités en Unités

10. Bibliographie

http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/T-ARZ200.pdf

Dietrich H., Will F. (1998); Vom Phänomen der Trübung; Getränkeindustrie; 2; S. 80 – 88.

Détermination de l'activité endo-1,4-□-xylanase dans les préparations enzymatiques

(*EC 3.2.1.8 ;* N°CAS : 9025-57-4) OIV-OENO 573-2018

Spécifications générales

Les hémicellulases sont généralement présentes dans les préparations enzymatiques parmi d'autres activités au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques qui figure dans le Codex Œnologique International.

1. Origine et application

Les hémicellulases catalysent la dégradation des hémicelluloses. Les hémicelluloses des parois des cellules de la baie de raisin sont principalement composées de xyloglucanes et d'arabinoxylanes ; ces deux polysaccharides représentent près de 90% des hémicelluloses du raisin.

L'activité hémicellulase des préparations enzymatiques est évaluée par la mesure de l'activité 1,4 -ß -xylanase. Les préparations enzymatiques renfermant des activités hémicellulases, sont utilisées lors de la macération du raisin, la clarification des moûts et des vins ainsi que pour améliorer leur filtrabilité.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées, par exemple, *d'Aspergillus sp.* ou de *Trichoderma sp.,* ou des mélanges d'enzymes ainsi obtenus.

2. Domaine d'application

La méthode de dosage a été mise au point à l'aide d'une xylanase commercialisée. Les conditions et la méthode ont été développées pour l'application aux préparations enzymatiques commerciales telles que trouvées sur le marché oenologique.

3. Principe

Les xylanases hydrolysent les chaînes de xylanes et libèrent ainsi les extrémités réductrices des oses constitutifs. La mesure de l'activité

xylanase est estimée en mesurant les oses réducteurs (xylose) libérés lors de la période d'incubation, selon la méthode de Nelson (1944). En milieu alcalin, le groupement pseudoaldéhydique des sucres réduit les ions cuivriques Cu2+. Ces derniers réagissent avec le réactif arséniomolybdique en donnant une coloration bleue dont l'absorbance, mesurée à 520 nm, varie de manière linéaire avec la concentration en oses (entre 0 et 400 µg/mL).

4. Appareillage

4.1 agitateur magnétique chauffant

4.2 bain d'eau à 40°C

4.3 bain d'eau à 100°C

4.4 fiole cylindrique de 100 mL

4.5 centrifugeuse pouvant recevoir des tubes en verre de 15 mL

4.6 chronomètre

4.7 fioles jaugées de 100 mL

4.7.1 fiole jaugée de 500 mL

4.8 seringue de précision 200 µL

4.8.1 seringue de précision 1 mL

4.9 pipette droite de 10 mL graduée au 1/10^{e} de mL

4.10 spectrophotomètre

4.11 tubes en verre de 15 mL

4.12 agitateur de type vortex

4.13 flacon en verre brun de 500 mL.

4.14 chambre à 4°C

4.15 étuve à 37°C

4.16 coton cardé

4.17 papier Kraft

4.18 pH mètre

4.19 portoir métallique pour tubes de 15 mL

4.20 cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible

5. Produits

5.1 acétate de sodium (CH_3COONa pur à 99% - PM = 82g/mole)

5.2 acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM = 60 g/mole, densité = 1,058)

5.3 xylane (Beechwood) P-XYLNBE-10G Lot N°171004a Megazyme

5.4 sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4 pur à 99,5% - PM = 142 g/mole)

5.5 carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM = 105,99 g/mole)

5.6 tartrate de potassium et de sodium ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ pur à 99% - PM = 282,2 g/mole)

5.7 hydrogénocarbonate de sodium anhydre ($NaHCO_3$ pur à 98% - PM = 84,01 g/mole)

5.8 sulfate de cuivre penta-hydraté ($CuSO45H_2O$ pur à 99% - PM = 249,68 g/mole)

5.9 acide sulfurique (H_2SO_4 pur à 98%) concentré

5.10 heptamolybdate d'ammonium ((NH4) $6MO_7O_{24}.4H_2O$ pur à 99% - PM = 1235,86 g/mole)

5.11 hydrogénoarséniate de sodium ($Na_2HAsO_4.7H_2O$ pur à 98,5% - PM

= 312,02 g/mole)

5.12 D-xylose ($C_5H_{10}O_5$ pur à 99% - PM = 150 g/mole)

5.13 eau distillée

5.14 préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1 Réactifs de la solution oxydante

Ces réactifs devront être préparés en premier, compte-tenu du délai de 24 heures pour la solution D.

6.1.1 Solution A :

Placer dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) successivement

- 20 g de sulfate de sodium anhydre (5.4)
- 2,5 g de carbonate de sodium anhydre (5.5)
- 2,5 g de tartrate de potassium et de sodium (5.6)
- 2 g de hydrogénocarbonate de sodium anhydre (5.7)

Dissoudre dans 80 mL d'eau distillée (5.13). Chauffer et mélanger (4.1) jusqu'à dissolution et transvaser dans une fiole de 100 mL (4.7). Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée (5.13).

Conserver à 37 °C (4.15) ; s'il se forme un dépôt : filtrer sur filtre plissé.

6.1.2 Solution B :

Dissoudre 15 g de sulfate de cuivre penta-hydraté (5.8) dans 100 mL d'eau distillée (5.13) et ajouter une goutte d'acide sulfurique concentré (5.9).

6.1.3 Solution C :

Cette solution est préparée extemporanément pour avoir une bonne proportionnalité entre la densité de couleur et la quantité de glucose en mélangeant 1 mL de solution B (6.1.2) avec 24 mL de solution A (6.1.1).

6.1.4 Solution D :

Dans une fiole jaugée de 500 mL (4.7.1), dissoudre 25 g de heptamolybdate d'ammonium (5.10) dans 400 mL d'eau (5.13). Ajouter

25 mL d'acide sulfurique concentré (5.9) (refroidi sous courant d'eau froide).

Dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) dissoudre 3 g d'hydrogénoarséniate de sodium (5.11) dans 25 mL d'eau (5.13) et transvaser quantitativement dans la fiole jaugée de 500 mL (4.7.1) contenant le molybdate d'ammonium (5.10).

Compléter avec de l'eau (5.13) pour avoir un volume final de 500 mL.

Placer à 37°C (4.15) pendant 24 heures puis conserver à 4°C (4.14) dans un flacon en verre brun de 500 mL (4.13).

6.2 Tampon acétate de sodium (pH 4,2, 100 mmol/L) Il est constitué des solutions A et B.

6.2.1 Solution A (acétate de sodium 0,1 M) : dissoudre 0,5 g d'acétate de sodium (5.1) dans 60 mL d'eau distillée (5.13)

6.2.2 Solution B (acide acétique 0,1 M) : étendre 1 mL d'acide acétique (5.2) par 175 mL d'eau distillée (5.13)

6.2.3 Préparation du tampon acétate de sodium : mélanger 23,9 mL de solution A (6.2.1) + 76,1 mL de solution B (6.2.2).

Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.18). La solution doit être conservée à 4°C (4.14).

6.3 Solution de xylane d'avoine à 2% (p/v)

Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7) dissoudre 1 g de xylane d'avoine (5.3) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.2).

6.4 Solution mère de Xylose à 400µg/mL

Dissoudre 0,040 g de D-xylose (5.12) dans 100 mL d'eau distillée (5.13).

7. Préparation de la gamme étalon de xylose

Une gamme étalon est réalisée à partir de la solution mère de xylose (de 0 à 400 µg/mL) (6.4) telle que présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : gamme étalon de xylose

Xylose (µg/mL)	**0**	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	**300**	**400**
Xylose (µmole/mL)	0	0,232	0,462	0,694	0,925	1,156	1,387	1,890
Vol solution mère (µL) (6.4.)	0	125	250	375	500	625	750	1000
Vol eau distillée (µL) (5.13)	1000	875	750	625	500	375	250	0

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés extemporanément.

8.1 Solution enzymatique à 2 g/L

Placer 200 mg de préparation enzymatique (5.14) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), compléter avec de l'eau distillée (5.13), agiter afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2 Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) dans un tube de 15 mL (4.11), boucher avec du coton cardé (4.16) recouvert de papier Kraft (4.17) et plonger le tube durant 5 min dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

9. Mode opératoire

9.1 Réaction enzymatique

Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 5 tubes de 15 mL (4.11) numérotés de 1 à 5, placés dans un

portoir (4.19)

Introduire 200 µL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision de 200 µL (4.8)

Introduire 400 µL de tampon acétate de sodium (6.2), à l'aide de la seringue de précision de 1 mL (4.8.1),

Et 600 µL de xylane d'avoine à 2% (6.3), enclencher le chronomètre (4.6)

Après agitation (4.12), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.16) et du papier Kraft (4.17) sont placés dans le bain d'eau à 40 °C (4.2) durant 1 mn pour le tube n°1

durant 2 mn pour le tube n°2 durant 5 mn pour le tube n°3 durant 10 mn pour le tube n°4 durant 20 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 40°C, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 min.

Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

9.2 Dosage des substances réductrices libérées (ici le xylose) Dans un tube de 15 mL (4.11)

placer 1 mL du milieu réactionnel (9.1) ajouter 1 mL de solution C (6.1.3)

après agitation (4.12), le tube est placé dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 min.

Le tube est ensuite refroidi sous courant d'eau froide. ajouter 1 mL de la solution D (6.1.4)

ajouter 9,5 mL d'eau (5.14) à l'aide de la pipette droite de 10 mL (4.9) attendre 10 mn pour la stabilisation de la couleur.

Centrifuger (4.5) chacun des tubes à 5000 rpm durant 10 min. Placer le surnageant dans une cuve (4.20).

Mesurer aussitôt l'absorbance à 520 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.10).

9.3 Blancs

Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). L'idéal est de réaliser la réaction enzymatique des blancs en même temps que celle de la solution enzymatique.

9.4 Gamme étalon

Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon de xylose de 0 à 400 µg/mL (7).

10. Calcul

10.1 Réalisation d'une cinétique

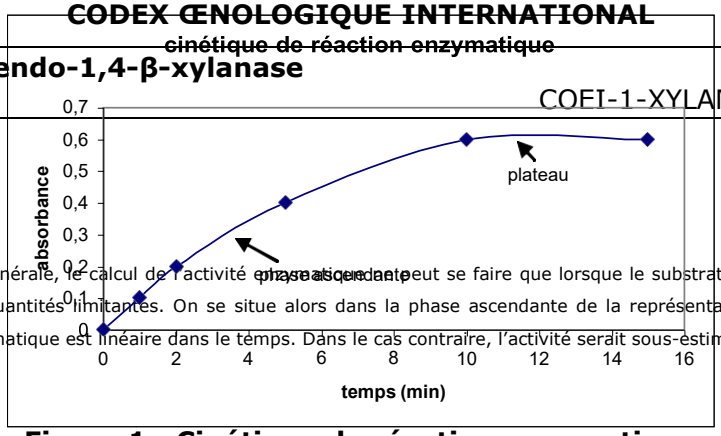


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous-estimée (Figure 1).

Une cinétique sur 15 min est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min T=15 min.

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2 Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme étalon de xylose (de 0 à 1,89 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente (Q/T) de la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3 Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 min pour le cas de la figure 1) en

déduire la quantité Q de xylose libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

L'activité enzymatique en U/g de préparation est calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité en U/g} = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

Avec :

Q : quantité de xylose formé en µmoles pendant un temps T (min) V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,2 mL

C : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 2 g/l L'activité catalytique en nanokatal :

Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde.

Activité en nkat/g = (activité en U/g) x (1000/60)

11. Caractéristiques de la méthode r= 0.056

R= 0.056

Sr= 0.02

SR= 0.02

La répétabilité de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la xylanase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,02 avec un pourcentage d'erreur de 9,7%. Le % d'erreur correspondant à :

(moyenne des écarts-types des valeurs x 100) moyenne des valeurs des essais

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non »

- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents. Si la puissance est faible ($\cong$ 20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.

Si la puissance est élevée ($\cong$ 80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2.

Dosages	**Hypothèses de l'analyse de variance**	**Probabilité**	**Puissance de l'essai (α = 5%)**	**Test Newman-Keuls (*)**	**Test Bonferroni (**)**
Xylanase	Respectées	0,00087	93%	Significatif	Significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi.

** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t (t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%, renforcée par une appartenance à un même groupe (Test Newmann-Keuls non significatif) et considérée comme non différente au risque α de première espèce (Test Bonferroni non significatif).

12. Références Bibliographiques

NELSON N. **A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose**. The may Institute for medical research of the Jewish hospital, 1944. p 375-380

Thierry Doco, et al. « Polysaccharides from grape berry cell walls. Part

II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides, Carbohydrate Polymers, Volume 53, Issue 3, 15 August 2003, Pages 253-261, »).

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ β-GLUCANASE (β 1-3, β 1-6) DANS LES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES

(Oeno 430/2010, OENO 488-2013)

Spécifications générales

Ces activités enzymatiques sont généralement présentes au sein d'une préparation enzymatique complexe. Dans la dégradation des ß-glucanes de *Botrytis cinerea*, des activités endo-ß-glucanase de type endo-ß-1,3 et exo-1,6 ß-glucosidase ainsi que des activités de type exo-ß-1,3 sont impliquées. Elles sont ici résumées sous le terme communément utilisé de ß-glucanases. Ces préparations enzymatiques sont également capables de dégrader les ß-glucanes dans la paroi cellulaire des cellules mourantes des levures *Saccharomyces*, ce qui contribue au processus appelé « élevage de vin sur lie ». Des activités endo-ß-1,3, endo-ß-1,6 ainsi que des activités exo ß-1,3, et exo-ß-1,6 sont impliquées dans ce processus. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution Oeno 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques incluse dans le Codex Œnologique International.

1. ORIGINE

Il convient de se référer au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant des activités ß-glucanases sont produites par fermentations directes, par exemple, de *Trichoderma harzianum, Trichoderma longibrachiatum* (*T. reesei*) et *Penicillium funiculosum* ».

2. DOMAINE D'APPLICATION

Il convient de se référer au Code international des pratiques œnologiques, OENO 11/04; 12/04; 15/04 et 3/85.

Les préparations enzymatiques contenant des activités ß 1-3 et ß 1-6 glucanase sont capables d'hydrolyser le glucane produit par *Botrytis cinerea* (pourriture noble et pourriture grise). Ce polysaccharide pose des problèmes importants pendant les processus de clarification et de filtration. De telles ß-glucanases sont donc employées spécifiquement pour la clarification et la filtration des vins produits à partir de raisins botrytisés.

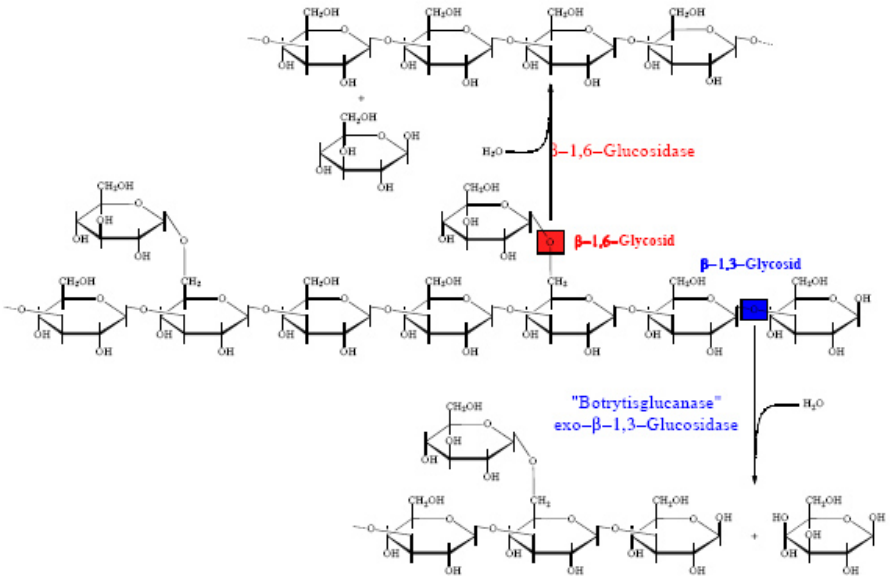
Les glucanes contenus dans les parois cellulaires des levures sont également hydrolysés par ces ß-glucanases. Elles peuvent être utilisées pour améliorer le processus de l'élevage sur lies ainsi que la filtrabilité.

3. PRINCIPE

La méthode d'analyse est basée sur le dosage du glucose libéré par l'enzyme, dont on veut mesurer l'activité, à partir d'une solution standardisée de glucane de *Schizophyllum* sp en tant que substrat.

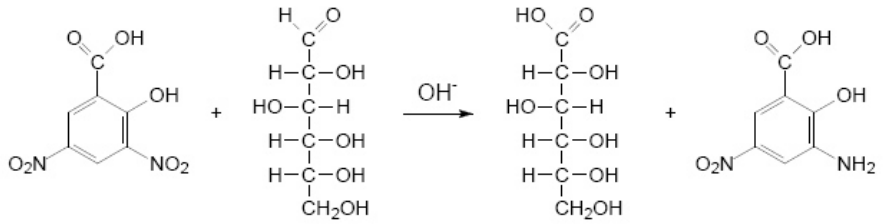
3.1 Définition des unités
L'unité de β-glucanase (β-Glu-U) est définie comme la quantité de sucres réducteurs, exprimée en glucose, qui est libérée dans des conditions d'essai par 1 g (ou 1 ml) d'enzyme par minute.

3.2 Rôle de l'enzyme
Botrytis cinerea excrète pendant sa croissance sur les raisins infectés (pourriture grise ou noble) un β-1,3-glucane qui possède à chaque troisième unité de glucose un résidu glycosilé de glucose en β-1,6 (Fig. 1). Ce glucane est très similaire à celui synthétisé par *Schizophyllum* sp.



3.3 Principe de la mesure

L'activité enzymatique libère du glucose qui, en solution basique, réduit l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique. Une addition de phénol augmente la sensibilité de la réaction. L'hydrogénosulfite de sodium sert à stabiliser la coloration.



4. APPAREILLAGE

4.1 Spectrophotomètre et cuvettes de 1 cm de parcours optique

4.2 Bain d'eau 40°C, 100°C

4.3 Agitateur magnétique standard
4.4 Agitateur magnétique multipoint submersible, réglé à 300 rpm
4.5 Flacons de mesure (ballons jaugés, vases cylindriques, flacons coniques…)
4.6 Becher
4.7 Micropipettes
4.8 Chronomètre
4.9 Bain à ultrasons
4.10 pHmètre

5. REACTIFS ET PRODUITS

5.1 Substrat
Solution mère de glucane fournie par l'université de Braunschweig dont la teneur en glucane a été déterminée par l'université de Braunschweig[6]

5.2 Produits purs

5.2.1 Acide citrique monohydrate (N° CAS 5949-29-1)
5.2.2 Hydroxyde de sodium (N° CAS 1310-73-2)
5.2.3 Tartrate de sodium et de potassium (N° CAS 304-59-6)
5.2.4 Métabisulfite de sodium $Na_2O_5S_2$ (N° CAS 7681-57-4)
5.2.5 Phénol (N° CAS 108-95-2)
5.2.6 Glucose anhydre
5.2.7 Acide 3,5-dinitro-2-hydroxybenzoïque (3,5-dinitrosalicylique) (N° CAS 609-99-4)
5.2.8 Eau distillée

5.3 Solutions

5.3.1 Solution d'hydroxyde de sodium 1M
Dans un ballon jaugé de 100 ml dissoudre 4,0 g d'hydroxyde de sodium (5.2.2) avec de l'eau distillée (5.2.8) et compléter au volume.

5.3.2 Solution tampon citrate (pH 4,0), 0,2 mol/l
Dans un ballon jaugé de 500 ml, 21,0 g d'acide citrique monohydrate (5.2.1) sont dissous dans 400 ml d'eau distillée, puis le pH est ajusté à 4,0 avec une

[6] Prof. Dr. Udo Rau, Technical University Braunschweig, Department of Biochemistry and Biotechnology Spielmannstr. 7, 38106 Braunschweig - Allemagne

solution molaire d'hydroxyde de sodium (5.3.1) et le volume est complété avec de l'eau distillée (5.2.8).

5.3.3 Solution tampon citrate (pH 4,0), 0,1 mol/l
Dans un ballon jaugé de 1000 ml, 21,0 g d'acide citrique monohydrate (5.2.1) sont dissous dans 900 ml d'eau distillée (5.2.8), puis le pH est ajusté à 4,0 avec une solution molaire d'hydroxyde de sodium (5.3.1) et le volume est complété avec de l'eau distillée (5.2.8).

5.3.4 Solution de titrage : réactif de couleur acide DNS-(dinitrosalicylique) au phénol
Il est préparé à partir des solution A,B,C ci-dessous :
5.3.4.1 Solution A :
Peser 154,2 g de tartrate de sodium et de potassium (5.2.3) dans un vase cylindrique de 800 ml et dissoudre complètement dans 500 ml d'eau distillée (5.2.8). Ajouter 9,7 g d'hydroxyde de sodium (5.2.2).

5.3.4.2 Solution B :
Dans un vase cylindrique de 2000 ml dissoudre complètement 5,3 g d'acide de 3,5-dinitrosalicylique (5.2.7) dans 500 ml d'eau distillée (5.2.8). Les meilleurs résultats sont réalisés en utilisant le bain à ultrasons.
5.3.4.3 Solution C :
Dans un vase cylindrique de 100 ml dissoudre 4,2 g de phénol (5.2.5) dans 50 ml d'eau distillée (5.2.8). Ajouter ensuite 1g d'hydroxyde du sodium (5.2.2) et après la dissolution complète, 4,2 g. bisulfite de sodium (5.2.4) et dissoudre de nouveau.
5.3.4.4 Solution de glucose à 0,3 %
Dans un ballon jaugé de 100 ml placer exactement 300 mg de glucose (5.2.6) dissoudre dans de l'eau distillée (5.2.8) puis compléter au volume avec de l'eau distillée.
5.3.4.5 Réactif DNS-couleur au phénol
Les solutions A et C sont mélangées à la solution B dans un vase cylindrique de 2000 ml qui est ensuite couvert avec du papier d'aluminium.
Avant l'emploi, conserver à l'obscurité pendant au moins 3 jours.
Transvaser le réactif dans un flacon en verre brun.
Entreposé dans un endroit sombre et à une température de 15-20 °C ; la solution peut être utilisée pendant un mois.
Pour chaque réactif nouvellement préparé et avant chaque mesure, un nouveau calibrage est effectué avant chaque analyse de l'enzyme.
Avant chaque utilisation, 3 ml d'une solution de glucose à 0,3 % (5.3.3.4), doivent être ajoutés à 200 ml du réactif DNS-couleur au phénol.

5.3.5 Glucane en solution à 0,1%, pH 4,0
Peser la quantité exacte de solution mère de glucane (5.1), pour obtenir une concentration finale de 1 g /l.
La solution finale de substrat doit contenir 50% de la solution tampon de citrate (pH 4,0), 0,2 mol/l (5.3.2).
Pour obtenir 100 ml de la solution de substrat à partir de la solution mère de glucane (5.1) (contenant réellement 5.2 g/l), 19,2 g sont pesés dans un vase cylindrique de 100 ml. 50 ml de la solution tampon de citrate (pH 4,0), 0,2 mol/l (5.3.2), sont ajoutés. Réaliser une solution homogène de glucane en remuant pendant au moins 15 minutes. La solution bien homogénéisée est ajustée à pH 4,0 avec une solution molaire de hydroxyde de sodium (5.3.1). La solution est transférée dans un ballon jaugé de 100 ml et plus tard complétée au volume avec de l'eau distillée (5.2.8).
Chaque solution mère de glucane est stockée à la température ambiante. Si une nouvelle solution mère de glucane est employée, un facteur de substrat de glucane (Gf = facteur de glucane) doit être déterminé au moyen de l'enzyme standard. Le facteur "Gf" de glucane est indispensable pour comparer des résultats des solutions mères précédentes de glucane aux nouvelles. Le facteur "Gf" de glucane est calculé avec les valeurs mesurées en considérant que l'activité enzymatique standard est de 10000 β□Glu U/g dans la formule (voir : Calcul de l'activité enzymatique).

5.4 Préparations enzymatiques

5.4.1 Solution Standard d'enzymes Glucanase :
0,5 g de préparation enzymatique Standard de Glucanase est dissoute dans 25 ml de la solution tampon de citrate (pH 4,0 ; 0,1 mol/l) (5.3.3) et complétée au volume de 100 ml avec de l'eau distillée (5.2.8).
5.4.2 Pour toutes les autres préparations enzymatiques :
1 ml de préparation enzymatique ou 0,5 g de préparation enzymatique solide en poudre ou en granulés sont dissoutes dans 25 ml de la solution tampon de citrate (pH 4,0 ; 0,1 mol/l) (5.3.3) et complété au volume de 100 ml avec de l'eau distillée (5.2.8). Si les valeurs d'absorption sont trop hautes ou trop basses (plage d'absorbance 0.1-0.6), une dilution appropriée est nécessaire. La dilution d'enzymes doit contenir 25 % de solution tampon citrate (5.3.3).

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Essai à blanc du réactif
Ajouter 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4) à 3 ml d'eau distillée (5.2.8) dans un ballon jaugé de 50 ml et les chauffer pendant exactement 10 minutes sur un bain d'eau bouillante. Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau de 20°C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge. Après 10 minutes à 20°C, compléter au volume.

6.2 Courbe d'étalonnage du glucose avec réactif DNS-couleur au phénol
Dissoudre 2,00 g de glucose (5.2.6) de dans un ballon jaugé de 200 ml et compléter au volume avec de l'eau distillée (5.2.8). À partir de cette solution courante, préparer les dilutions comme suit :

N°	V solution courante / 100 ml	glucose/100 ml	glucose (µg) dans l'essai (= 0,5 ml)
1	2 ml	20 mg	100 µg
2	5 ml	50 mg	250 µg
3	10 ml	100 mg	500 µg
4	15 ml	150 mg	750 µg
5	20 ml	200 mg	1,000 µg
6	30 ml	300 mg	1,500 µg
7	40 ml	400 mg	2,000 µg

Introduire à la pipette 0,5 ml de chaque dilution de glucose dans un ballon jaugé de 50 ml et ajouter 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4) et 2,5 ml d'eau distillée (5.2.8). Chauffer les récipients de mesure pendant exactement 10 minutes dans un bain d'eau bouillante. Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau à 20 °C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge. Après 10 minutes à 20 °C compléter au volume. Mesurer l'absorbance des solutions au spectrophotomètre dans les 15 minutes suivantes, à la longueur d'onde de 515 nm contre le blanc (réactif seul).
Porter dans un diagramme la quantité de glucose libérée dans l'essai contre l'absorption à 515 nm (Fig. 2).
La courbe d'étalonnage est exécutée le même jour avant chaque analyse de l'enzyme.

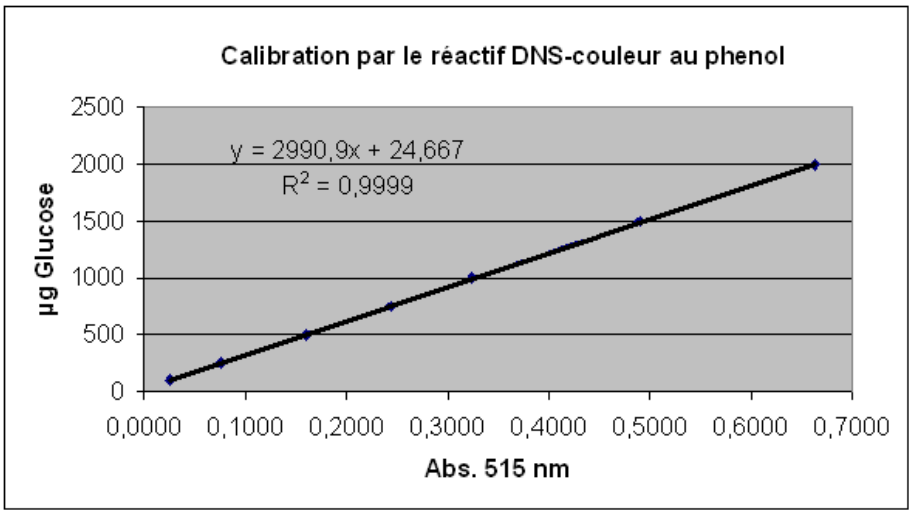


Figure 2

6.3 Essai à blanc des enzymes

Introduire à la pipette 0,5 ml de chaque solution d'enzymes (5.4.1 ou 5.4.2) dans un ballon jaugé de 50 ml et ajouter 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4). Mélanger soigneusement et ajouter 2,5 ml de la solution de substrat (5.3.5). Bien mélanger par agitation manuelle. Ensuite chauffer tous les échantillons sur un bain d'eau bouillante pendant exactement 10 minutes. Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau de 20°C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge. Après 10 minutes à 20°C compléter au volume. Mesurer l'absorbance des solutions au spectrophotomètre dans les 15 minutes suivantes, à la longueur d'onde de 515 nm contre le blanc (réactif seul).

6.4 Mesure de l'activité des préparations enzymatiques

Pour chaque échantillon d'enzymes, 10 ml de substrat (5.3.5) sont placés dans une fiole conique durant 5 minutes dans un bain d'eau à 40 °C. Les échantillons doivent être homogénéisés à l'aide d'un agitateur magnétique multipoint submersible réglé à 300 rpm.

Après 5 minutes, 2 ml de la solution d'enzymes (5.4.1 ou 5.4.2) sont ajoutés dans le premier échantillon et un chronomètre est démarré juste après l'addition de la première solution d'enzymes.
Ajouter ensuite les solutions d'enzymes suivantes à tous les autres échantillons avec décalage de 30 secondes pour chaque échantillon.
Les échantillons doivent être agités ensuite à 300 rpm durant tout le temps de réaction.
Après exactement 15 minutes prélever 3 ml du premier mélange, suivis de tous autres échantillons avec un décalage de 30 secondes.
Chaque mélange de 3 ml est introduit à la pipette dans un nombre correspondant de ballons jaugés de 50 ml, contenant chacun 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4).
Ensuite chauffer tous les échantillons sur un bain d'eau bouillante pendant exactement 10 minutes en respectant le décalage de 30 secondes entre les échantillons.
Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau à 20 °C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge.
Après 10 minutes à 20°C compléter au volume. Mesurer l'absorbance des solutions au spectrophotomètre dans les 15 minutes suivantes, à la longueur d'onde de 515 nm contre le blanc (réactif seul).
La différence d'absorption entre la lecture à blanc d'enzymes et la valeur après réaction doit être comprise entre 0,1 et 0,6 unité d'absorbance.
Si les valeurs sont au delà de la gamme de mesure de la courbe d'étalonnage, répéter l'essai avec des dilutions adaptées des enzymes.

Avec toutes les enzymes, préparer toujours 1 lecture à blanc de l'enzyme et 2 valeurs après réaction. Les deux valeurs après réactions doivent être proches.

7. CALCULS

Pour le calcul de l'activité utiliser la valeur moyenne des deux mesures.
L'activité enzymatique d'une préparation enzymatique est calculée selon la formule suivante.

$$\text{Activité β-Glu-Unité/g ou ml} = (G \times 200)/(15 \times E) \times 1/Gf$$

$$\text{Nkat/g ou ml} = (\text{Activité β-Glu-Unité/g ou ml}) \times (1000/60)$$

G = quantité de sucres réducteurs libérés dans l'essai (sucres réducteurs libérés par Δ = moyenne de 2 répétitions de l'absorbance après réaction – l'absorbance de l'enzyme blanc, calculée en glucose à partir de la courbe de calibration du glucose en µg).

E = quantité d'enzyme diluée à 100 ml en g ou ml
200 = facteur de dilution
15 = temps de réaction en min
Gf = facteur de glucane (à calculer)

Exemple de calcul :

enzyme	Valeur mesurée 1	2	Enzyme Blanc	E	µg glucose	Unités ß-Glu/g ou ml
Enzyme Utilisée	0,621	0,618	0,415	0,503	662	10325
Penicillium funiculosum ß-Glucanase	0,417	0,416	0,023	1	1249	9799

Calcul du Gf :

1 réaliser la mesure avec l'ancien substrat et l'enzyme standard (Valeur 1)
2 réaliser la mesure avec le nouveau substrat et l'enzyme standard (valeur 2)

Calcul : valeur 1 / Valeur 2

8. BIBLIOGRAPHIE

Bertrand A. Détermination de l'activité β-glucanase de *Botrytis* des préparations enzymatiques OIV FV 1263.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE CINNAMOYL ESTERASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

(OENO 6/2007, OENO 487-2013)

Deux méthodes différentes sont proposées pour la mesure de l'activité cinnamoyl estérase, faute de disposer du précurseur principal, l'acide para-coumaroyltartrique ; la première fait appel à l'activité chlorogénase d'*Aspergillus niger* soit l'hydrolyse de l'acide chlorogénique (caféoylquinique) ; elle nécessite la mise en œuvre du matériel traditionnel des mesures enzymatiques.
La seconde méthode concerne l'hydrolyse du cinnamate d'éthyle dont la teneur est mesurée par chromatographie en phase gazeuse.

Les deux méthodes ont été comparées, et elles donnent des résultats comparables.

SPÉCIFICATIONS GÉNÉRALES

Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution Oeno 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques incluse dans le Codex Œnologique International.

1. Origine

Ces activités enzymatiques sont souvent présentes dans des préparations telles que les enzymes pectolytiques par fermentations dirigées d'*Aspergillus sp*.

2. Domaines d'applications

Cette activité est responsable de la production de phénols volatils qui influent négativement sur les propriétés sensorielles des vins, en particulier des vins blancs. D'autre part, seules des études limitées ont démontré que cette activité semble avoir un effet positif sur la stabilisation de la couleur des vins rouges.

3. Méthode A. CHLOROGÉNATE HYDROLASE ou CHLOROGÉNASE (EC 3.1.1.42 – CAS n° 74082-59-0)

3.1. Principe

La cinnamoyl estérase dégrade l'acide chlorogénique en libérant de l'acide caféique. La diminution de l'absorbance mesurée à 350 nm liée à la disparition de ce substrat permet de quantifier l'activité cinnamoyl estérase.

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui permet une chute de l'absorbance de 1 unité à pH 6,5 et à 30 °C.

3.2. Appareillage

3.2.1. bain d'eau à 30°C
3.2.2. bain d'eau à 100°C
3.2.3. fiole jaugée de 2 litres
3.2.4. erlen de 125 mL
3.2.5. fiole jaugée de 100 mL
3.2.6. fiole jaugée de 1000 mL
3.2.7. chronomètre
3.2.8. seringue de précision de 100 µL
3.2.9. seringue de précision de 1000 µL
3.2.10. seringue de précision de 5000 µL
3.2.11. pipette droite de 5 mL graduée
3.2.12. pH mètre
3.2.13. spectrophotomètre
3.2.14. tubes à vis en verre de 15 mL
3.2.15. portoir métallique pour tubes de 15 mL
3.2.16. cuves de 1 cm de parcours optique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans l'UV
3.2.17. agitateur de type Vortex

3.3. Produits

3.3.1 méthanol (Analytical Reagent Grade – CH_3OH - PM = 32,04 g/mol)
3.3.2 dihydrogénophosphate de sodium ($NaH_2PO_4,2H_2O$ pur à 99 % - PM = 156,01 g/mol)
3.3.3 hydroxyde de sodium (NaOH pur à 99 % - PM = 40 g/mol)
3.3.4 acide chlorogénique (pur à 95 % - PM = 354,30 g/mol)
3.3.5 eau distillée
3.3.6 préparation enzymatique commerciale à analyser

3.4. Solutions

3.4.1 Méthanol à 80 % (v/v)
Introduire 100 mL de méthanol (3.3.1) dans un erlen de 125 mL (3.2.4) additionné de 25 mL d'eau distillée (3.3.5).

3.4.2 Solution d'hydroxyde de sodium à 9M :
Introduire 360g d'hydroxyde de sodium (3.3.3) dans une fiole jaugée de 1000 mL (3.2.6) et compléter avec de l'eau distillée (3.3.5).

3.4.3 Tampon phosphate 0,1M (pH 6,5)
Introduire 31,5 g de dihydrogénophosphate de sodium (3.3.2) dans une fiole jaugée de 2 litres (3.2.3) additionné de 1,8 litres d'eau distillée (3.3.5).
Ajuster le pH à 6,5 à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium (3.4.2) et d'un pH mètre (3.2.11). Ensuite ajuster le volume à 2 litres avec de l'eau distillée (3.3.5).

3.4.4 Solution d'acide chlorogénique à 0,06 % (p/v)
Dissoudre 0,06 g d'acide chlorogénique (3.3.4) dans une fiole jaugée de 100 mL (3.2.5) additionné de tampon phosphate (3.4.3) jusqu'au trait de jauge.

3.5. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés extemporanément.

3.5.1 Solution enzymatique à 10 g/L
Placer 1g de préparation commerciale (3.3.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (3.2.5), compléter avec du tampon phosphate (3.4.3), agiter (3.2.17) afin d'obtenir un mélange homogène.

3.5.2. Blanc dénaturé par chauffage
Placer 10 mL de la solution enzymatique à 10 g/L (3.5.1) dans un tube de 15 mL (3.2.14) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (3.2.2).

3.6. Mode opératoire

3.6.1 Réaction enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.
Dans 4 tubes de 15 mL (3.2.14) numérotés de 1 à 4, placés dans un portoir (3.2.15) introduire 100 µL de la solution enzymatique à 10 g/L (3.5.1), à l'aide de la seringue de précision (3.2.8),
500 µL de la solution d'acide chlorogénique (3.4.4), enclencher le chronomètre (3.2.7).
Après agitation (3.2.17), les tubes sont placés dans le bain d'eau à 30 °C (3.2.1)
durant 120 mn pour le tube n°1

durant 240 mn pour le tube n°2
durant 330 mn pour le tube n°3
durant 400 mn pour le tube n°4

La réaction est stoppée en ajoutant 5 mL de méthanol à 80 % (3.4.1) à l'aide d'une pipette droite (3.2.11) dans chacun des tubes numérotés de 1 à 4, immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 30°C. Les tubes sont ensuite agités.

3.6.2 Dosage des substances libérées (acide caféique)
Le milieu réactionnel (3.6.1) est placé dans une cuve de 1cm de parcours optique (3.2.16). Mesurer aussitôt l'absorbance à 350 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (3.2.13). La mesure sera réalisée contre un blanc qui sera du méthanol à 80% (3.4.1).

3.7. Calculs

3.7.1 Réalisation d'une cinétique
De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

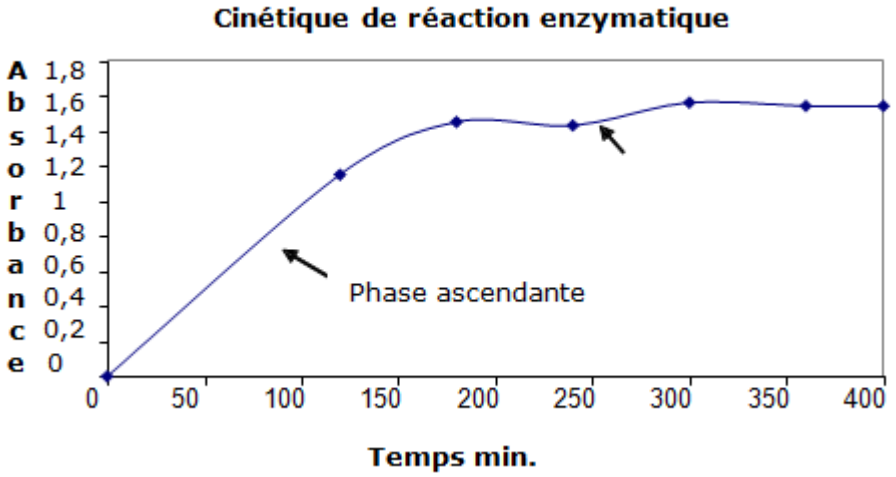


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 400 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=120 min T=180 min, T=240 min, T=300 min T=360 min T=400 min.
Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

3.7.2 Calcul de l'activité enzymatique

L'activité cinnamoyl estérase est calculée à partir de la diminution d'absorbance par heure étant donné que cette activité est très faible dans les préparations. La formule de calcul est la suivante

Activité en U/g = $1000 \times ((DO_0 - DO_T)/T) / (VxC)$

Avec DO_0 : Valeur de l'absorbance du blanc
DO_T : Valeur de l'absorbance au temps T (heure)
V : quantité de solution enzymatique introduite (µL); ici 100 µL
C : concentration de la solution enzymatique (g/L); ici 10 g/L

4. Méthode B. HYDROLYSE DU CINNAMATE D'ÉTHYLE

4.1. Principe

La cinnamoyl estérase hydrolyse le cinnamate d'éthyle. La diminution de cet ester mesurée par chromatographie en phase gazeuse permet de quantifier l'activité cinnamoyl estérase.

4.2. Appareillage

4.2.1 Chromatographe en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme ou à spectrométrie de masse équipé d'une colonne capillaire de type carbowax 20 M 50 m x 0.2 mm x 0,2 µm d'épaisseur de phase
4.2.2 Agitateur magnétique et barreaux d'agitation
4.2.3 Verrerie de laboratoire (pipettes de précision de 5 mL, fioles coniques, fioles jaugées de 50 mL, 100 mL, flacons en verre de laboratoire de 10 mL, 60 mL, 150 mL…)
4.2.4 Pipettes Pasteur
4.2.5 Seringues de précision de 200 µL, 50 µL et de 10 µL
4.2.6 Etuve à 25°C
4.2.7 Balance de précision à 0,1 mg/L
4.2.8 pHmètre

4.3. Produits

4.3.1 Méthanol (Analytical Reagent Grade – CH_3OH - PM = 32,04 g/mol)
4.3.2 Acide citrique pur à 99%
4.3.3 hydroxyde de sodium (NaOH pure à 99% - PM = 40 g/mol)
4.3.4 Cinnamate d'éthyle (pur à 99% - PM = 176 g/mol)
4.3.5 Eau distillée ou permutée
4.3.6 Préparation enzymatique commerciale à analyser.
4.3.7 Ethanol pur à 99 % vol
4.3.8 Ether diéthylique pur à 99 %.
4.3.9 Dodécanol pur

4.4. Solutions

4.4.1 Ethanol à 12 % (v/v)
Introduire 12 mL d'éthanol (4.3.7) dans une fiole jaugée de 100 mL l (4.2.3) compléter au volume avec de l'eau distillée (3.3.5).
4.4.2 Solution d'hydroxyde de sodium 4 M
Introduire 16 g d'hydroxyde de sodium pure dans une fiole jaugée de 100 mL compléter avec de l'eau distillée agiter jusqu'à dissolution.
4.4.3 Tampon citrate à pH 6,5
Introduire 0,05 g d'acide citrique (4.3.2) dans un flacon de 150 mL (4.2.3), rajouter 100 mL d'éthanol à 12 % vol (4.4.1) dissoudre à l'aide d'un agitateur magnétique. Placer sous agitation magnétique en présence de l'électrode du pH mètre (4.2.8) amener à pH 6,5 en ajoutant goutte à goutte l'hydroxyde de sodium 4 M (4.4.2).
4.4.4 Solution mère de cinnamate d'éthyle à 500 mg/L
A l'aide d'une seringue de précision (4.2.5) placer 50 µL de cinnamate d'éthyle (4.3.4) dans une fiole jaugée de 100 mL contenant un peu d'éthanol pur (4.3.7) compléter au trait de jauge avec de l'éthanol pur (4.3.7) homogénéiser

4.4.5 Solution de cinnamate d'éthyle à 25 mg/L dans le tampon citrate
Dans une fiole jaugée de 100 mL placer 5 mL mesuré avec une pipette de précision (4.2.3) de solution mère de cinnamate d'éthyle à 500 mg/L (4.4.4) compléter à 100 mL avec le tampon citrate à pH 6,5 vol (4.4.3). Homogénéiser

Remarque : il ne faut pas préparer une solution de cinnamate d'éthyle plus concentrée car cet ester risquerait d'être partiellement insoluble.

4.4.6 Solution de dodécanol à 0,5 g/L (étalon interne)
A l'aide d'une seringue de précision (4.2.5) placer 50 µL de dodécanol pur (4.3.9) dans une fiole jaugée de 100 mL contenant un peu d'éthanol pur

(4.3.7) compléter au trait de jauge avec de l'éthanol pur (4.3.7) homogénéiser.

4.5. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple.

4.6. Mode opératoire

4.6.1 Réaction enzymatique : Dans un flacon de laboratoire de 60 mL placer 50 mL de solution de cinnamate d'éthyle à 25 mg/L (4.4.5) ajouter environ 100 mg de la préparation enzymatique commerciale à analyser (4.3.6) pesée avec précision (4.2.7) soit P le poids.
Après agitation (4.2.2), le flacon est bouché et laissé sur la paillasse ou si possible dans une étuve à 25 °C (4.2.6)
4.6.2 Un prélèvement de 200 µL est effectué avec une seringue de précision (4.2.5) après 3 heures, 24 heures, 72 heures.

4.6.3 La réaction est stoppée en ajoutant le prélèvement (4.6.2) de 200 µL dans un flacon de 10 mL contenant 0,5 mL de méthanol (4.3.1) et 1 mL d'éther (4.3.8)

4.6.4 Ajout de l'étalon interne
Dans la préparation (4.6.3) ajouter à l'aide d'une seringue de précision (4.2.5) 50 µL de dodécanol à 500 mg/L (4.4.6) homogénéiser.

4.6.5 Blanc
Procéder comme en 4.6.3 et 4.6.4 en ne mettant pas les 200 µL du prélèvement de la réaction enzymatique (4.6.2)

4.6.6 Solution de référence
Procéder comme en 4.6.3 et 4.6.4 en plaçant dans le flacon (4.2.3) 200 µL de solution de cinnamate d'éthyle à 25 mg/L (4.4.5) à la place du prélèvement de la réaction enzymatique (4.6.2)

4.6.7 Chromatographie

4.6.7.1 Injecter 2 µL du blanc (4.6.5) dans le chromatographe pour repérer l'étalon interne. Lancer le programmateur de température et l'acquisition des données.

4.6.7.2 Injecter 2 µL de la solution de référence pour repérer le cinnamate d'éthyle (c.e) et l'étalon interne (e.i) en mesurer les surfaces respectives Sce0 Sei0

4.6.7.3 Injecter dans les mêmes conditions que 4.6.7.2 les prélèvements 4.6.4 après 3 heures puis 24 heures puis 72 heures. Soit les surfaces respectives de cinnamate d'éthyle résiduel et d'étalon interne S3 et Sei3; S24 Sei24, S72 Sei72.

Déterminer la quantité de cinnamate d'éthyle résiduelle pour chacun des prélèvements ; par exemple pour 72 heures.

$$CE72 = \frac{25 \times Sei0}{SCE0} \times \frac{SCE\ 72}{Sei72}$$

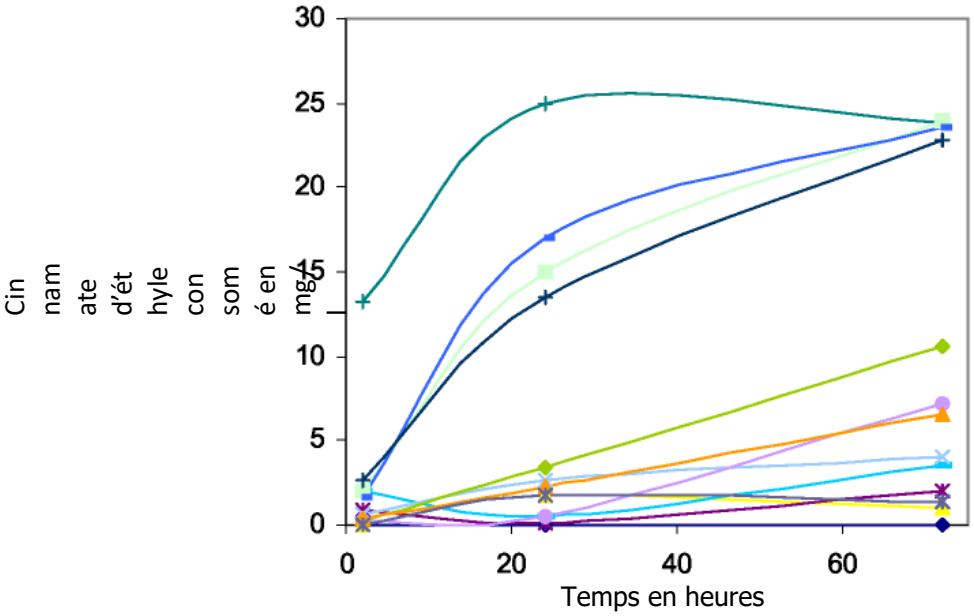
$$CE\ consommé\ en\ 72\ heures = \frac{25 - CE\ 72}{}$$

Activité cinnamyl esterase en mg de cinnamate d'éthyle hydrolysé par heure et par g de préparation enzymatique

$$Activité\ CE\ en\ mg\ CE/g\ enzyme/heure = \frac{25 \times CE\ 72}{P \times 25 \times 72} \times 1000$$

P = poids d'enzyme ajouté dans la préparation (6.1) en mg/L.

4.7. Commentaires : La méthode a été librement adaptée de Barbe (1995). La réaction ayant lieu à pH 6,5 est beaucoup plus complète qu'au pH du vin où elle est environ 10 fois plus lente ; donc, si après 72 Heures, quelques mg seulement de cinnamate d'éthyle ont été dégradés on peu considérer que l'activité CE dans le vin sera négligeable.



Exemples d'activités cinnamoyl estérase mesurées à pH 6,5, de préparations enzymatiques commerciales.

5. Bibliographie

Barbe ch., 1995, recherche sur les activités estérases contaminantes des préparations pectolytiques. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux 2.

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ CELLULASE DANS LES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES (endo-(1→4)-β-D-glucanase) (EC 3.2.1.4 – CAS n° 9012-54-8)

(Oeno 8/2008, OIV-Oeno 486B-2012)

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes parmi d'autres activités au sein de complexes enzymatiques. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques qui figure dans le Codex Œnologique International.

1. Origine

Référence est faite au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant cette activité sont produites par fermentations directes, par exemple, de Aspergillus niger Trichoderma longibrachiatum (T. reesei), Penicillium sp., Talaromyces emersonii ou Rhizopus oryzae.

2. Domaine d'application

Référence est faite au Code International des Pratiques Œnologiques, Oeno 11/04 ; 12/04 ; 13/04 ; 14/04 et 15/04.

Les enzymes catalysant la dégradation des polysaccharides des parois cellulaires du raisin, l'endo-(1→4)-β-D-glucanase principalement, sont utiles à l'accélération et à l'accomplissement du processus de macération des raisins. Elles ont également un effet positif sur la filtration et la clarification, permettant une dégradation enzymatique plus complète des polysaccharides.

3. Principe

L'endo-(1→4)-β-D-glucanase catalyse l'hydrolyse de façon aléatoire des liaisons osidiques au sein de la cellulose. Son activité peut donc être appréciée en dosant les sucres réducteurs (exprimés en glucose), libérés lors de l'incubation, par la méthode de NELSON (1944).
On ne mesure que les activités de types « endo- » du fait de la présence de groupements carboxyméthyles qui bloquent l'action des exo-glucanases. Les endo-glucanases agissent à l'intérieur des chaînes dans les zones non carboxyméthylées. En milieu alcalin, le groupement pseudoaldéhydique des sucres réduit les ions cuivriques Cu^{2+}. Ces derniers réagissent avec le réactif arséniomolybdique en donnant une coloration bleue dont l'absorbance, mesurée à 520 nm, varie de manière linéaire avec la concentration en oses (entre 0 et 250 µg/mL).

4. Appareillage

4.1 agitateur magnétique chauffant
4.2 bain d'eau à 40°C
4.3 bain d'eau à 100°C
4.4 vase cylindrique de 100 mL
4.5 centrifugeuse pouvant recevoir des tubes en verre de 15 mL
4.6 chronomètre
4.7 fiole jaugée de 100 mL
    4.7.1 fiole jaugée de 500 mL
4.8 seringue de précision 200 µl
    4.8.1 seringue de précision 1 mL
4.9 pipette droite de 10 mL graduée au $1/10^{e}$ de mL
4.10 spectrophotomètre
4.11 tubes en verre de 15 mL
4.12 agitateur de type vortex
4.13 flacon en verre brun de 500 mL.
4.14 chambre à 4°C
4.15 étuve à 37°C
4.16 coton cardé
4.17 papier Kraft
4.18 pH mètre
4.19 portoir métallique pour tubes de 15 mL
4.20 cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible
4.21 sonde à ultra-son

5. Produits

5.1 acétate de sodium (CH_3COONa pur à 99% - PM = 82 g/mole)
5.2 acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM = 60 g/mole, densité = 1,058)
5.3 carboxyméthylcellulose (CMC) ayant un degré de substitution de 65 à 95%.
5.4 cellulase de *Trichoderma reesei* (Fluka, 4U/mg, réf : 22173) à titre d'exemple. Une unité, libère 1 µmole de glucose provenant de la carboxyméthylcellulose par minute.
5.5 sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4 pur à 99,5% - PM = 142 g/mole)
5.6 carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM = 105,99 g/mole)
5.7 tartrate de potassium et de sodium ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ pur à 99% - PM = 282,2 g/mole)
5.8 hydrogénocarbonate de sodium anhydre ($NaHCO_3$ pur à 98% - PM = 84,01 g/mole)
5.9 sulfate de cuivre penta-hydraté ($CuSO_4.5H_2O$ pur à 99% - PM = 249,68 g/mole)
5.10 acide sulfurique (H_2SO_4 pur à 98%) concentré
5.11 heptamolybdate d'ammonium ($(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$ pur à 99% - PM = 1235,86 g/mole)
5.12 hydrogénoarséniate de sodium ($Na_2HAsO_4.7H_2O$ pur à 98,5% - PM = 312,02 g/mole). **Compte tenu de la toxicité de ce produit, une attention particulière doit être portée lors de sa manipulation. Les déchets doivent être traités de manière appropriée.**
5.13 D-glucose anhydre ($C_6H_{12}O_6$ pur à 99% - PM = 180,16 g/mole)
5.14 eau distillée
5.15 préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1 Réactifs de la solution oxydante
Ces réactifs devront être préparés en premier, compte-tenu du délai de 24 heures pour la solution D.
6.1.1 Solution A : Placer dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) successivement
20 g de sulfate de sodium anhydre (5.5)
2,5 g de carbonate de sodium anhydre (5.6)
2,5 g de tartrate de potassium et de sodium (5.7)
2 g de hydrogénocarbonate de sodium anhydre (5.8)

Dissoudre dans 80 mL d'eau distillée (5.14). Chauffer (4.1) jusqu'à dissolution et transvaser dans une fiole de 100 mL (4.7). Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée (5.14).
Conserver à 37 °C (4.15) ; s'il se forme un dépôt : filtrer à l'aide d'un filtre plissé.

6.1.2 Solution B :
Dissoudre 15 g de sulfate de cuivre hydraté (5.9) dans 100 mL d'eau distillée (5.14) et ajouter une goutte d'acide sulfurique concentré (5.10). Conserver à 4°C.

6.1.3 Solution C :
Cette solution est préparée extemporanément pour avoir une bonne proportionnalité entre la densité de couleur et la quantité de glucose en mélangeant 1 mL de solution B (6.1.2) avec 24 mL de solution A (6.1.1).

6.1.4 Solution D :
Dans une fiole jaugée de 500 mL (4.7.1), dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium (5.11) dans 400 mL d'eau (5.14). Ajouter 25 mL d'acide sulfurique concentré (5.10) (refroidi sous courant d'eau froide).

Dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) dissoudre 3 g d'arséniate de sodium (5.12) dans 25 mL d'eau (5.14) et transvaser quantitativement dans la fiole jaugée de 500 mL (4.7.1) contenant le molybdate d'ammonium (5.11).

Compléter avec de l'eau (5.14) pour avoir un volume final de 500 mL.

Placer à 37°C (4.15) pendant 24 heures puis conserver à 4°C (4.14) dans un flacon en verre brun de 500 mL (4.13).

6.2 Tampon acétate de sodium (pH 4,2, 100 mM)
Il est constitué des solutions A et B.
6.2.1 Solution A : acétate de sodium 0,1 M : dissoudre 0,5 g d' acétate de sodium (5.1) dans 60 mL d'eau distillée (5.14)
6.2.2 Solution B : acide acétique 0,1 M : étendre 1 mL d'acide acétique (5.2) par 175 mL d'eau distillée (5.14)
6.2.3 Préparation du Tampon acétate de sodium : mélanger 23,9 mL de solution A (6.2.1) + 76,1 mL de solution B (6.2.2).
Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.18).
La solution doit être conservée à 4°C (4.14).

6.3 Solution de carboxyméthylcellulose (CMC) à 2% (p/v) à préparer extemporanément
Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7) introduire 2 g de CMC (5.3) dans 100 mL d'eau distillée (5.14)

Compte-tenu de la grande viscosité et afin d'avoir une solution homogène, il faut pouvoir soniquer (4.21), agiter sans chauffer (4.1) et la garder en suspension sous agitation constante.

6.4 Solution mère de glucose à 250 µg/mL
Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), dissoudre 0,0250g de glucose (5.13) dans de l'eau distillée (5.14) en complétant à 100 mL.

7. Préparation de la gamme étalon de glucose

Elle est réalisée à partir de la solution mère de glucose à 250 µg/mL (6.4.), comme indiqué dans le tableau n°1.

Tableau 1 : gamme étalon de glucose à partir de la solution mère

Glucose (µg/mL)	0	25	50	100	150	200	250
Glucose (µmole/mL)	0	0,139	0,278	0,555	0,833	1,110	1,388
Vol (µl) solution mère (6.4)	0	100	200	400	600	800	1000
Vol (µl) eau distillée (5.14)	1000	900	800	600	400	200	0

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés au moment de l'utilisation.

8.1 Solution enzymatique à 2 g/l à préparer extemporanément
Placer 200 mg de préparation commerciale (5.15) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), compléter avec de l'eau distillée (5.14), agiter afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2. Blanc dénaturé par chauffage à préparer extemporanément
Placer 10 mL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) dans un tube de 15 mL (4.11), boucher avec du coton cardé (4.16) recouvert de papier Kraft (4.17) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3). Puis refroidir et centrifuger pendant 5 min à 6 500 g.

9. Mode opératoire

9.1 Cinétique enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.
Dans 5 tubes de 15 mL (4.11) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.19) dans un bain d'eau à 40°C, introduire
200 µl de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8), 400 µl de tampon acétate de sodium (6.2), à l'aide de la seringue de précision (4.8.1),
600 µl de la solution de carboxyméthylcellulose (6.3) préalablement portée à 40°C dans le bain d'eau, enclencher le chronomètre (4.6).
Après agitation (4.12), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.16) et du papier Kraft (4.17) sont replacés dans le bain d'eau à 40 °C (4.2)

durant 1 mn pour le tube n°1
durant 2 mn pour le tube n°2
durant 5 mn pour le tube n°3
durant 10 mn pour le tube n°4
durant 15 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 40°C, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.

Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

Note : le point de cinétique à 10 min permet d'évaluer l'activité enzymatique recherchée.

9.2 Dosage des substances réductrices libérées
Dans un tube de 15 mL (4.11)
placer 1 mL du milieu réactionnel (9.1)
ajouter 1 mL de solution C (6.1.3)
après agitation (4.12), le tube est placé dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.

Le tube est ensuite refroidi sous courant d'eau froide.

ajouter 1 mL de la solution D (6.1.4)
ajouter 9,5 mL d'eau (5.14) à l'aide de la pipette droite de 10 mL (4.9)
attendre 10 mn pour la stabilisation de la couleur.
Centrifuger (4.5) chacun des tubes à 2430 g durant 10 mn.
Placer le surnageant dans une cuve (4.20).
Réaliser le zéro du spectrophotomètre avec de l'eau distillée.
Mesurer aussitôt l'absorbance à 520 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.10).

9.3 Blancs
Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2Pour chaque point de cinétique, la réaction enzymatique de chaque blanc est réalisée en même temps que celle de la solution enzymatique.

9.4 Gamme étalon
Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon de glucose de 0 à 250µg/mL (7).

10. Calculs

10.1 Réalisation d'une cinétique
De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

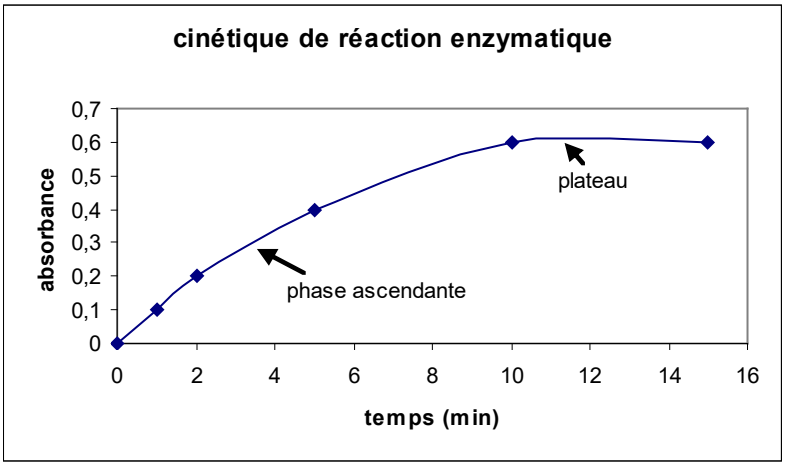


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 15 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min, T=15 min.

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2 Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme étalon de glucose (de 0 à 0,693 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente (Q/T) de la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3 Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 mn pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q de glucose libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

La formule pour calculer l'activité enzymatique en U/g de préparation est la suivante :

$$\text{Activité en U/g} = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

Avec Q : quantité de glucose libéré en µmoles pendant un temps T (min)
V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,2 mL
C : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 2 g/l

Ensuite, il est possible d'exprimer l'activité enzymatique en nanokatal. Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde dans les conditions définies par les protocoles de dosages et donc :

$$\text{Activité en nkat/g} = \text{activité en U /g} \times (1000/60)$$

11. Caractéristiques de la méthode

r	0,084
R	0,056
Sr	0,03
SR	0,02

La répétabilité intralaboratoire de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la carboxyméthylcellulase, la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,03 avec un pourcentage d'erreur de 13,56. Le % d'erreur correspondant à :

$$\frac{\text{(moyenne des écarts-types des valeurs x 100)}}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité intralaboratoires ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non ». Cette analyse de variance donne un écart type de reproductibilité de 0,02.
- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.
  Si la puissance est faible ($\cong$ 20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.
  Si la puissance est élevée ($\cong$ 80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2 :

Dosages	**Hypothèses de l'analyse de variance**	**Probabilité**	**Puissance de l'essai (α = 5%)**	**Test Newman-Keuls (*)**	**Test Bonferroni (**)**
Endo-(1→4)-β-D-glucanase	Respectées	0,00011	95%	Significatif	Significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi

** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t (t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%.

12. Bibliographie

NELSON N., A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose. The may Institute for medical research of the Jewish hospital, 1944. p 375-380.

Activités enzymatiques et leurs mesures – Document OIV, FV 1226, 2005

DETERMINATION DES ACTIVITES GLYCOSIDASES DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

(Oeno 5/2007, OIV-Oeno 489-2012, OIV-Oeno 451-2012)

Introduction

Les enzymes de type glycosidases sont utilisées pour la révélation des arômes des vins à partir de leurs précurseurs glycosylés.

Les molécules aromatiques sont en partie sous forme d'hétérosides ; la plupart d'entre elles sont liées à du glucose ; la mesure de l'activité enzymatique capable de couper cette liaison spécifique fait l'objet d'une description sous « activité β-D-glucosidase ». Toutefois, cette activité n'est pas réellement opérante si le glucose est lui-même lié à un autre sucre (ce qui est le cas pour la majorité de ces précurseurs aromatiques). Il s'agit essentiellement de l'apiose, de l'arabinose, du rhamnose et du xylose.

Afin de mesurer la réelle efficacité de la préparation enzymatique pour révéler le potentiel aromatique du raisin ou du vin, il convient de compléter la mesure relative à l'activité β-D-glucosidase par la mesure des activités apiofuranosidase, arabinofuranosidase, β-D-galactosidase, rhamnosidase, xylosidase.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE β-D-GLUCOSIDASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES (activité β-D-glucosidase) (EC 3.2.1.21 – CAS n° 9001-22-3)

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes parmi d'autres activités, au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques qui figure dans le Codex Œnologique International.

1. Origine

Référence est faite au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités sont produites par fermentations directes d'Aspergillus niger.

2. Domaine d'application

Référence est faite au Code International des Pratiques Œnologiques, Oeno 16/04 et 17/04.

Les enzymes du type glucosidase sont utilisées pour révéler et rehausser les arômes des vins. Cela est réalisé au travers de l'hydrolyse de leurs précurseurs d'arômes glycolysés. Les enzymes peuvent également être ajoutées avant la fin de la fermentation alcoolique, mais ne deviendront actives qu'uniquement après finalisation de la fermentation alcoolique.

3. Principe

L'hydrolyse enzymatique du β-D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du glucose et du *para*-Nitrophenol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

4. Appareillage

4.1 agitateur magnétique
4.2 bain d'eau à 30°C
4.3 bain d'eau à 100°C
4.4 cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible
4.5 glace pilée
4.6 seringue de précision 500 – 5000 µL
4.7 seringue de précision 100 µL
4.8 seringue de précision 1000 µL
4.9 spectrophotomètre
4.10 tubes eppendorf
4.11 fiole jaugée de 100 mL
4.12 pH mètre
4.13 chambre froide à 4°C
4.14 portoir métallique pour tubes eppendorf
4.15 coton cardé
4.16 papier Kraft

4.17 agitateur de type vortex
4.18 chronomètre
4.19 tubes en verre de 15 mL

5. Produits

5.1 Carbonate de sodium (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM : 105,99 g/mole)
5.2 Acétate de sodium (CH_3COONa pur à 99% - PM : 82g/mole)
5.3 Acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM : 60g/mole)
5.4 β-D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle (Fluka, réf. 73676) à titre d'exemple
5.5 β-D-glucosidase (Fluka ; 250 mg ; 6,3 U/mg, réf. 49290) à titre d'exemple. Une unité, correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole de glucose par minute à pH 5 et 35 °C.
5.6 *p*-nitrophénol (*p*-Np) ($C_6H_5NO_3$ pur à 99,5% - PM : 139,11 g/mole)
5.7 Eau distillée
5.8 Préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1 Tampon acétate de sodium (100 mM, pH 4,2)
Il est constitué des solutions A et B.
6.1.1 Solution A : introduire 0,5 g d'acétate de sodium (5.2) dans 60 mL d'eau distillée (5.7)
6.1.2 Solution B : introduire 1 mL d'acide acétique (5.3) dans 175 mL d'eau distillée (5.7)
6.1.3 Préparation du tampon acétate de sodium : Mélanger 47,8 mL de solution A (6.1.1) + 152 mL de solution B (6.1.2).
Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.12).
Conserver à 4°C

6.2 Solution de β-D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle 4mM
Mettre 0,096 g de β-D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1.).

6.3 Solution de carbonate de sodium 1M
Dissoudre 10,6 g de carbonate de sodium (5.1) dans 100 mL d'eau distillée (5.7) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11). La solution peut être stockée à 4°C (4.13).

6.4 Solution mère de *p*-nitrophénol (*p*-Np) à 125 µg/mL

Dissoudre 0,01 g de *p*-Np (5.6) dans 80 mL d'eau distillée (5.7).

La solution mère doit être préparée extemporanément.

7. Préparation de la gamme étalon de p-nitrophénol (p-Np) de 0 à 50 µg/mL

Elle est constituée à partir de la solution mère de *p*-nitrophénol (*p*-Np) (6.4.) comme indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 : Gamme étalon de *para-Nitrophénol*

Quantité de p-NP (µg)	**0**	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
Concentration en p-NP (µg/mL)	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**
Concentration en p-NP (µmol/mL)	**0**	**0,072**	**0,14**	**0,22**	**0,29**	**0,36**
Volume de solution mère (6.4) (µL)	**0**	**16**	**32**	**48**	**64**	**80**
Eau distillée (5.7) (µL)	**200**	**184**	**168**	**152**	**136**	**120**

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés extemporanément.

8.1 Solution enzymatique à 10 g/l
Placer 1 g de préparation commerciale (5.8) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11), compléter avec de l'eau distillée (5.7), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2 Blanc dénaturé par chauffage
Placer 10 mL de la solution enzymatique à 10 g/l (8.1) dans un tube de 15 mL (4.19), boucher avec du coton cardé (4.15) recouvert de papier Kraft (4.16) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

9. Mode opératoire

9.1 Réaction enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 5 tubes eppendorf (4.10) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.14) dans de la glace pilée (4.5) introduire
100 µL de la solution de β-D-Glucopyranoside de *p*-nitrophényle (6.2), à l'aide d'une seringue de précision (4.7),
100 µL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1), enclencher le chronomètre (4.18)

Après agitation (4.17), les tubes eppendorf sont placés dans le bain d'eau à 30 °C (4.2)
durant 1 mn pour le tube n°1
durant 2 mn pour le tube n°2
durant 5 mn pour le tube n°3
durant 10 mn pour le tube n°4
durant 15 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 30°C, dans un bain de glace pilée (4.5)

9.2 Dosage du *p*-nitrophénol libéré
A partir des tubes eppendorf contenant les différents milieux réactionnels (9.1)
Ajouter 600 µL de solution de carbonate de sodium (6.3), à l'aide d'une seringue de précision (4.8),
1,7 mL d'eau distillée (5.7), à l'aide d'une seringue de précision (4.6),
Placer le mélange résultant dans une cuve (4.4).
Mesurer aussitôt l'absorbance à 400 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.9)

9.3 Blancs
Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). L'idéal est de réaliser la réaction enzymatique des blancs en même temps que celle de la solution enzymatique.

9.4 Gamme étalon
Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon de *p*-nitrophénol de 0 à 50 µg/mL (7).

10. Calculs

10.1 Réalisation d'une cinétique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

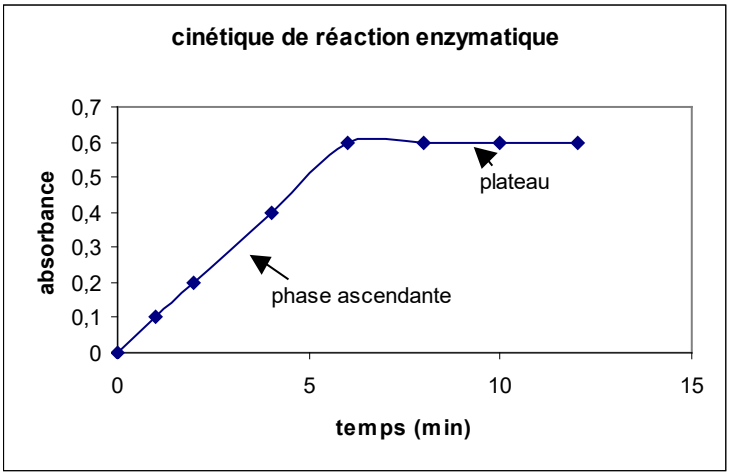


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 12 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=4 min, T=6 min T=8 min T=10 min, T=12 min.

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2 Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme étalon de *p.*nitrophénol (de 0 à 0,36 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente (Q/T) de la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3 Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 mn pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q de *p*-nitrophénol libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

La formule pour calculer l'activité enzymatique en U/g de préparation est la suivante :

$$\text{Activité en U/g} = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

Avec Q : quantité de *p.*nitrophénol formé en µmoles pendant un temps T (min)

V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,1 mL

C : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 2 g/l

Ensuite, il est possible d'exprimer l'activité enzymatique en nanokatal. Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde dans les conditions définies par les protocoles de dosages et donc :

Activité en nkat/g = (activité en U /g) *(1000/60)

11. Caractéristiques

La répétabilité de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la β-D-Glucosidase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,01 avec un pourcentage d'erreur de 8,43. Le % d'erreur correspondant à :

(moyenne des écarts-types des valeurs x 100)

moyenne des valeurs des essais

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non »
- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.
  Si la puissance est faible ($\cong$ 20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.
  Si la puissance est élevée ($\cong$ 80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2.

Dosages	**Hypothèses de l'analyse de variance**	**Probabilité**	**Puissance de l'essai (α = 5%)**	**Test Newman-Keuls (*)**	**Test Bonferroni (**)**
β-D-glucosidase	Respectées	0,0285	42%	Non significatif	Non significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi

** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t

(t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%, renforcée par une appartenance à un même groupe (Test Newmann-Keuls non significatif) et considérée comme non différente au risque α de première espèce (Test Bonferroni non significatif).

DETERMINATION DE DIVERSES ACTIVITES GLUCOSIDASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

β-D-galactosidase (EC 3.2.1.23 – CAS n° 9031-11-2)
α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55 – CAS n° 9067-74-7)
α-L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40 – CAS n° 37288-35-0)
β-D-xylosidase (EC 3.2.1.37 – CAS n° 9025-53-0)

Spécifications générales

Ces activités enzymatiquessont généralement présentes parmi d'autres activités, au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution Oeno 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques qui figure dans le Codex Œnologique International.

1. Origine

Référence est faite au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités sont produites par fermentations directes d'*Aspergillus niger par exemple*.

2. Domaines d'applications

Référence est faite au Code international des pratiques œnologiques, OENO 16/04 et 17/04.

Les activités glycosidases sont utilisées pour révéler et rehausser les arômes des vins en se basant sur l'hydrolyse de la fraction osidiquede leurs précurseurs glycolysés. Les enzymes peuvent également être ajoutées au moût, mais leurs efficiences technologiques ne deviendront actives qu'uniquement après finalisation de la fermentation alcoolique.

3. Principe

Les préparations enzymatiques du commerce à activité glycosidases contiennent des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons glycosidiques entre le glucose et d'autres oses -notamment : l'apiose, le galactose, l'arabinose, le rhamnose et le xylose- permettant ensuite la libération des composés aromatiques liés au glucose grâce à l'activité glucosidase. De la même manière, ces enzymes peuvent hydrolyser la liaison de composés de synthèse constitués de ces différents composés osidiques et de *p*-nitrophénol. Ceci permet de mesurer ces différentes activités.

Dosage de l'activité β-D-galactosidase L'hydrolyse enzymatique du β-D-galactopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du galactose et du *para*-Nitrophenol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

Dosage de l'activité α-L-arabinofuranosidase
L'hydrolyse enzymatique du α-L-arabinofuranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère de l'arabinose et du *p*nitrophénol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

Dosage de l'activité α-L-rhamnosidase
L'hydrolyse enzymatique du α-L-rhamnopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du rhamnose et du *p*-nitrophénol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

Dosage de l'activité β-D-xylosidase
L'hydrolyse enzymatique du β-D-xylopyranoside de *p*-nitrophényle qui est incolore, libère du xylose et du -*n*itrophenol (*p*-Np) ; ce dernier prend une coloration jaune en présence de carbonate de sodium dont on mesure l'absorbance à 400 nm.

4. Appareillage

4.1 agitateur magnétique
4.2 bain d'eau à 40°C
4.3 bain d'eau à 100°C
4.4 cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible
4.5 glace pilée
4.6 seringues de précision 500 – 5000 µL
4.7 seringue de précision 100 µL
4.8 seringue de précision 1000 µL
4.9 spectrophotomètre
4.10 tubes eppendorf
4.11 fiole jaugée de 100 mL
4.12 pH mètre
4.13 chambre froide à 4°C
4.14 portoir métallique pour tubes eppendorf
4.15 coton cardé
4.16 papier Kraft
4.17 agitateur de type vortex
4.18 chronomètre
4.19 tubes en verre de 15 mL

5. Produits

5.1 Carbonate de sodium (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM : 105,99 g/mole)
5.2 Acétate de sodium ($NaCH_3COO$ pur à 99% - PM : 82g/mole)
5.3 Acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM : 60g/mole)
5.4 *p*-nitrophénol (*p*-Np) ($C_6H_5NO_3$ pur à 99,5% - PM : 139,11 g/mole)
5.5 Eau distillée
5.6 Préparation enzymatique commerciale à analyser
et en fonction de la mesure de l'activité à considérer :
5.7a β-D-galactopyranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N1252, 250 mg) à titre d'exemple
5.7b α-L-arabinofuranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N3641, 10 mg) à titre d'exemple
5.7c α-L-rhamnopyranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N7763, 100 mg) à titre d'exemple

5.7d β-D-xylopyranoside de *p*-nitrophényle (Sigma réf. N2132, 500 mg) à titre d'exemple

6. Solutions

Pour le dosage de l'activité α-L-arabinofuranosidase ou α-L-rhamnosidase

6.1 Tampon acétate de sodium (100 mM, pH 4,4)
Il est constitué des solutions A et B.
6.1.1 Solution A : introduire 0,984 g d'acétate de sodium (5.2) dans 60 mL d'eau distillée (5.5)
6.1.2 Solution B : introduire 2 mL d'acide acétique (5.3) dans 175 mL d'eau distillée (5.5)
6.1.3 Préparation du tampon acétate de sodium : Mélanger 78 mL de solution A (6.1.1) + 122 mL de solution B (6.1.2).
Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.12).
Conserver à 4°C

Pour le dosage de l'activité β-D-galactosidase ou β-D-xylosidase

6.1 Tampon acétate de sodium (100 mM, pH 4,0)
Il est constitué des solutions A et B.
6.1.1 Solution A : introduire 0,984 g d'acétate de sodium (5.2) dans 60 mL d'eau distillée (5.5)
6.1.2 Solution B : introduire 2 mL d'acide acétique (5.3) dans 175 mL d'eau distillée (5.5)
6.1.3 Préparation du tampon acétate de sodium : Mélanger 36 mL de solution A (6.1.1) + 164 mL de solution B (6.1.2).
Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.12).
Conserver à 4°C

6.2 Solution réactives (en fonction de la mesure de l'activité enzymatique à considérer)
a) Solution de α-L-arabinofuranoside de *p*-nitrophényle 4 mM
Mettre 0,086 g de α-L-arabinofuranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).
b) Solution de β-D-galactopyranoside de *p*-nitrophényle 4 mM
Mettre 0,096 g de β-D-galactopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).
c) Solution de α-L-rhamnopyranoside de *p*-nitrophényle 4 mM

Mettre 0,091 g de α-L-rhamnopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).
d) Solution de β-D-xylopyranoside de *p*-nitrophényle 4 mM
Mettre 0,0868 g de β-D-xylopyranoside de *p*-nitrophényle (5.4) dans 80 mL de tampon acétate de sodium (6.1).

6.3 Solution de carbonate de sodium 1M
Dissoudre 10,6 g de carbonate de sodium (5.1) dans 100 mL d'eau distillée (5.5) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11). La solution peut être stockée à 4°C (4.13).

6.4 Solution mère de *p*-nitrophénol à 125 µg/mL
Dissoudre 0,01 g de *p*-nitrophénol (5.4) dans 80 mL d'eau distillée (5.5).

La solution mère doit être préparée extemporanément.

7. Préparation de la gamme étalon de *p*-nitrophénol de 0 à 100 µg/mL

Elle est constituée à partir de la solution mère de *p*-nitrophénol (6.4.) comme indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 : Gamme étalon de *p*-nitrophénol (*p*.Np)

Quantité de *p*-Np (µg)	0	4	8	12	16	20
Concentration en *p*-Np (µg/mL)	0	20	40	60	80	100
Concentration en *p*-Np (µmol/mL)	0	0,14	0,29	0,43	0,58	0,72
Volume de solution mère (6.4) (µL)	0	16	32	48	64	80
Eau distillée (5.5) (µL)	200	184	168	152	136	120

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés extemporanément.

8.1 Solution enzymatiques

Pour le dosage de l'activité α-L-rhamnosidase ou β-D-xylosidase

Solution enzymatique à 10 g/L

Placer 1 g de préparation commerciale (5.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11), compléter avec de l'eau distillée (5.5), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

Pour le dosage de l'activité α-L-arabinofuranosidase

Solution enzymatique à 1 g/L

Placer 100 mg de préparation commerciale (5.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11), compléter avec de l'eau distillée (5.5), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

Pour le dosage de l'activité β-D-galactosidase

Solution enzymatique à 2 g/L

Placer 100 mg de préparation commerciale (5.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.11), compléter avec de l'eau distillée (5.5), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2 Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique (8.1) dans un tube de 15 mL (4.19), boucher avec du coton cardé (4.15) recouvert de papier Kraft (4.16) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

9. Mode opératoire

9.1 Réaction enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 6 tubes eppendorf (4.10) numérotés de 1 à 6, placés dans un portoir (4.14) dans de la glace pilée (4.5) introduire

100 µL de la solution réactive à considérer (6.2), à l'aide d'une seringue de précision (4.7),

100 µL de la solution enzymatique correspondante (8.1), enclencher le chronomètre (4.18)

Après agitation (4.17), les tubes eppendorf sont placés dans le bain d'eau à 40 °C (4.2)
durant 2 mn pour le tube n°1
durant 5 mn pour le tube n°2
durant 10 mn pour le tube n°3
durant 15 mn pour le tube n°4
durant 20 mn pour le tube n°5
durant 30 mn pour le tube n°6

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 6 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 40°C, dans un bain de glace pilée (4.5)

9.2 Dosage du *p*-nitrophénol libéré
A partir des tubes eppendorf contenant les différents milieux réactionnels (9.1)
Ajouter 600 µL de solution de carbonate de sodium (6.3), à l'aide d'une seringue de précision (4.8),
1,7 mL d'eau distillée (5.5), à l'aide d'une seringue de précision (4.6),
Placer le mélange résultant dans une cuve (4.4).
Mesurer aussitôt l'absorbance à 400 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.9)
(On peut également simplifier en indiquant : Voir point 9.2 de la mesure de l'activité β-D-glucosidase)

9.3 Blancs
Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). L'idéal est de réaliser la réaction enzymatique des blancs en même temps que celle de la solution enzymatique.

9.4 Gamme étalon
Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon de *p*-nitrophénol de 0 à 100 µg/mL (7).

10. Calculs

10.1 Réalisation d'une cinétique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

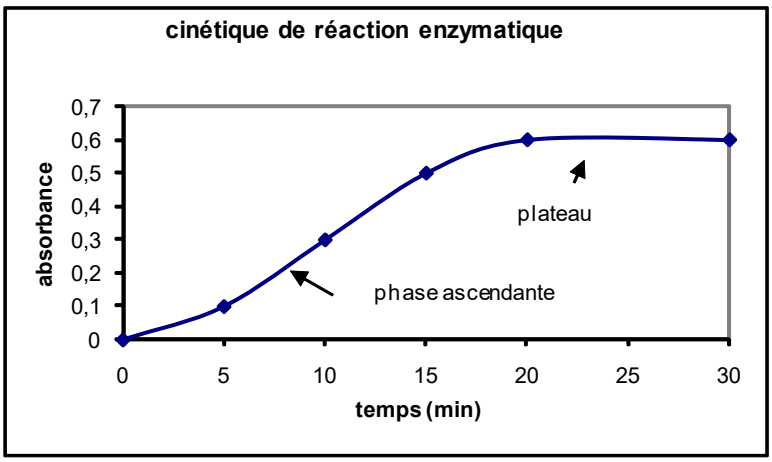


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 30 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=2 min, T=5 min, T=10 min, T=15 min, T=20 min, T=30 min.

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2 Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme

étalon de *p*.nitrophénol (de 0 à 0,72 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3 Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 mn pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q de *p*-nitrophénol libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

La formule pour calculer l'activité enzymatique en U/g de préparation est la suivante :

Activité en U/g = Q/T/V/C*1000

Avec Q : quantité de *p*-nitrophénol formé en µmoles pendant un temps T (min)

V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,1 mL

C : concentration de la solution enzymatique (g/L) ici 10 g/L

Ensuite, il est possible d'exprimer l'activité enzymatique en nanokatal. Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde dans les conditions définies par les protocoles de dosages et donc :

Activité en nkat/g = activité en U /g *1000/60

11. Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois.
Le tableau suivant récapitule les résultats :

Activité	**moyenne des écarts-types des valeurs**	**pourcentage d'erreur (%)**
α-L-arabinofuranosidase	0	5
β-D-galactosidase	0,03	3,78
α-L-rhamnosidase	0,001	4,66
β-D-xylosidase	0,03	3,78

Le % d'erreur correspondant à :

$$\frac{\text{(moyenne des écarts-types des valeurs x 100)}}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non »
- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.

- Si la puissance est faible ($\cong$ 20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe

peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.
Si la puissance est élevée (≅ 80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2.

Dosages	Hypothèses de l'analyse de variance	Probabilité	Puissance de l'essai (α = 5%)	Test Newman-Keuls (*)	Test Bonferroni (**)
α-L-arabinofuranosidase	Respectées	0,0125	45%	Non significatif	Non significatif
β-D-galactosidase	Respectées	0,01	75%	Non significatif	Non significatif
α-L-rhamnopyranoside	Respectées	0,006	65%	Non significatif	Non significatif
β-D-xylosidase	Respectées	0,0253	73%	Non significatif	Non significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi
** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t (t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%, renforcée par une appartenance à un même groupe (Test Newmann-Keuls non

significatif) et considérée comme non différente au risque α de première espèce (Test Bonferroni non significatif).

12. Bibliographie

- M. Lecas. Thèse de Doctorat, 1994. Composition et structure des polymères constitutifs des parois cellulaires de la pellicule de la baie de raisin. Application d'enzymes fongiques liquéfiant les parois à fins d'extraction des substances odorantes.
- Dugelay. Thèse de Doctorat, 1993. L'arôme du raisin : étude des précurseurs hétérosidiques et des activités enzymatiques exogènes impliquées dans leur hydrolyse – Applications technologiques.

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ PECTINELYASE DANS LES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES
(activité PECTINELYASE)
(EC 4.2.2.10. – CAS n° 9033-35-6)
(OIV-Oeno 314-2009, OIV-Oeno 491-2012)

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes parmi d'autres activités au sein de complexes enzymatiques. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution Oeno 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques qui figure dans le Codex Œnologique International.

1. Origine et application oenologique

Référence est faite au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités sont produites par fermentations directes de, par exemple, Aspergillus niger.

2. Domaine d'application

Référence est faite au Code International des Pratiques Œnologiques, Oeno 11/04 ; 12/04 ; 13/04 ; 14/04 et 15/04.

Ces activités enzymatiques sont utilisées pour favoriser la macération du raisin et l'extraction du jus de raisin, pour aider à la clarification des moûts et des vins, ainsi que pour améliorer leur filtrabilité.

3. Principe

Cette activité enzymatique se traduit par une dégradation des pectines hautement méthylées par β-élimination des acides galacturoniques méthylés. Il se crée ainsi un système de doubles liaisons conjuguées fortement délocalisées et absorbant dans l'ultra violet.

4. Appareillage

4.1 agitateur magnétique
4.2 bain d'eau à 25°C
4.3 bain d'eau à 100°C
4.4 fiole jaugée de 1000 mL
  4.4.1 fiole jaugée de 100 mL
4.5 chronomètre
4.6 cuves de 1 cm de trajet optique en quartz, pour spectrophotomètre, pour mesure dans l'UV
4.7 pH mètre
4.8 seringues de précision 100 µL
  4.8.1 seringues de précision 1000 µL
4.9 spectrophotomètre
4.10 tubes de 15 mL
4.11 agitateur de type vortex
4.12 portoir métallique pour tubes de 15 mL
4.13 chambre à 4°C
4.14 coton cardé
4.15 papier Kraft

5. Produits

5.1 Pectine d'agrume de degré d'estérification 63-66% (Pectin from citrus peel, Fluka, Réf. 76280), à titre d'exemple.
5.2 Hydroxyde de sodium (NaOH, pur à 99% - PM = 40 g/mole)
5.3 Acide citrique ($C_6H_8O_7.H_2O$, pur à 99,5% - PM = 210,14 g/mole)
5.4 Dihydrogénophosphate de sodium ($NaH_2PO_4.2H_2O$, pur à 99% - PM = 156,01 g/mole)
5.5 Pectinelyase d'*Aspergillus niger* purifiée (Sigma ; 30 U; 50-150 U/mg prot, réf : P7052), à titre d'exemple. Une unité, entraîne une variation d'absorbance à 235 nm de 1 par minute à 40 °C.
5.6 Eau distillée
5.7 Préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1 Solution d'Hydroxyde de sodium 1M
Introduire 40 g d'hydroxyde de sodium (5.2) dans une fiole jaugée de 1000mL (4.4) et compléter avec de l'eau distillée (5.6).

6.2 Tampon Mc Ilvaine (Devries *et al*.).

Il est constitué des solutions A et B.

6.2.1 Solution A : acide citrique à 100 mM : dissoudre 4,596 g d'acide citrique (5.3) dans 200 mL d'eau distillée (5.6)

6.2.2 Solution B : dihydrogénophosphate de sodium à 200 mM : dissoudre 6,25 g de dihydrogénophosphate de sodium (5.4) dans 200 mL d'eau distillée (5.6).

6.2.3 Préparation du tampon Mac Ilvaine

Mélanger 50% de solution A (6.2.1) + 50% de solution B (6.2.2) et ajuster le pH à 6 à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium (6.1).

La solution doit être conservée à 4°C (4.13). Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.7)

6.3 Solution de Pectine d'agrume à 1% (p/v)

Dissoudre 0,5 g de pectine (5.1) dans 50 mL de tampon Mc Ilvaine (6.2).

7. Préparation de l'échantillon

7.1 Solution enzymatique à 10 g/l

Placer 1g de préparation commerciale (5.7) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.4.1), compléter avec de l'eau distillée (5.6), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

7.2. Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 10 g/l (7.1) dans un tube de 15 mL (4.10), boucher avec du coton cardé (4.14) recouvert de papier Kraft (4.15) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

8. Mode opératoire

8.1 Réaction enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 5 tubes de 15 mL (4.10) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.12) introduire

400 µL de Tampon Mc Ilvaine (6.2) à l'aide d'une seringue de précision 1000 µL (4.8.1)

100 µL de la solution enzymatique à 10 g/l (7.1) à l'aide d'une seringue de précision 100 µL (4.8)

500 µL de solution de pectine d'agrume (6.3), enclencher le chronomètre (4.5)

Après agitation (4.11), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.14) et du papier Kraft (4.15), sont placés dans le bain d'eau à 25°C (4.2)
durant 1 mn pour le tube n°1
durant 2 mn pour le tube n°2
durant 5 mn pour le tube n°3
durant 10 mn pour le tube n°4
durant 15 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée par un réchauffement rapide (30 secondes max) en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) et en ajoutant des solutions concentrées acide ou basique comme réactif d'arrêt . Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

8.2 Dosage des substances libérées

Le milieu réactionnel (8.1) est dilué au dixième avec de l'eau distillée (5.6). La dilution est placée dans une cuve (4.6) de 1 cm de parcours optique. Mesurer aussitôt l'absorbance à 235 nm, à l'aide d'un spectrophomètre (4.9).

8.3 Blancs

Opérer comme décrit en 8.1 en remplaçant la solution enzymatique par le blanc dénaturé par chauffage (7.2).

9. Calculs

9.1 Réalisation d'une cinétique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

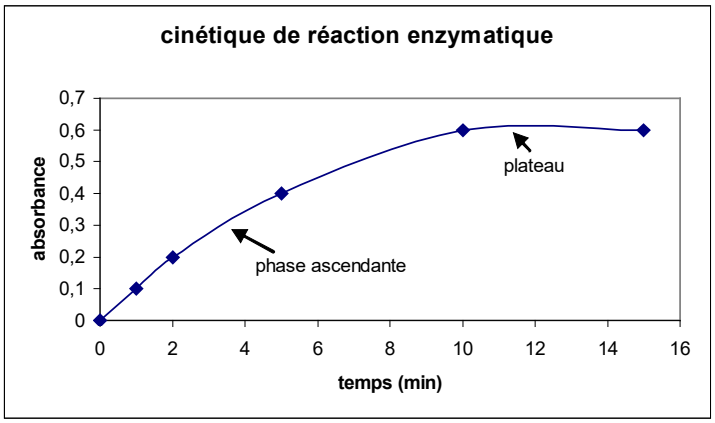


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 15 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min T=15

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer la pente (DO/T) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

9.2 Calcul de l'activité enzymatique

Le calcul de l'activité enzymatique de la pectinelyase s'effectue grâce au coefficient d'extinction molaire de la molécule formée (ε = 5500 $M^{-1}cm^{-1}$). Ainsi la formule a appliquer est la suivante :

$$\text{Activité en U/g} = (DO_T/T)/(0.1/V) \times (1000/(5.5/C))$$

Avec DO_T : Valeur de l'absorbance au temps T (min)
V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) : ici 0,1 mL
C : concentration de la solution enzymatique (g/l) : ici 10 g/l

Il est désormais possible d'exprimer d'ativité enzyatique en nanokatals. Cette unité corresponde aux nombres de nanomoles de produit formés

par seconde sous les conditions définies par les protocoles de détermination et par conséquence :

Activité en nkat/g= (activité en U/g) x (1000/60)

10. Caractéristiques de la méthode

r= 0.056
R= 0.056
Sr= 0.02
S_R= 0.02

La répétabilité de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la pectine lyase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,01 avec un pourcentage d'erreur de 4,66. Le % d'erreur correspondant à :

$$\frac{\text{(moyenne des écarts-types des valeurs x 100)}}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non »
- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.
- Si la puissance est faible ($\cong$ 20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.

- Si la puissance est élevée (≅ 80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 1.

Dosages	Hypothèses de l'analyse de variance	Probabilité	Puissance de l'essai (α = 5%)	Test Newman-Keuls (*)	Test Bonferroni (**)
PL	Respectées	0,00725	87%	Significatif	Significatif

Tableau 1 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi
** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t (t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%.

11. Références Bibliographiques

DE VRIES J.A., F. M. ROMBOUTS F.M., VORAGEN A.G.J., PILNIK W. **Enzymatic degradation of apple pectins.** Carbohydrate Polymers, 2, 1982, 25-33.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE POLYGALACTURONASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

activités endo et exo polygalacturonases (PG)

(EC 3.2.1.15 – CAS n° 9032-75-1)

(Oeno 10/2008, OIV-OENO 364-2012)

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes parmi d'autres activités, au sein d'un complexe enzymatique, mais peuvent également être disponible sous forme purifiée, soit par purification d'un complexe de pectinase, soit produites directement par des Microorganismes Génétiquement Modifiés. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365/2009 relative aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques incluses dans le Codex Œnologique International.

1. Origine

On se reportera au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations d'enzymes qui contiennent une telle activité sont produites par fermentation dirigée, comme par exemple, d'*Aspergillus niger,* de *Rhizopus oryzae* et de *Trichoderma reesei* ou *longibrachiatum*.

2. Domaine d'application

Référence est faite au Code International des Pratiques Œnologiques, OENO 11/04 ; 12/04; 13/04 ; 14/04 et 15/04

Ces activités enzymatiques sont utilisées pour contribuer à l'efficacité de la macération du raisin et à l'extraction du jus de raisin, pour aider à la clarification des moûts et des vins, ainsi que pour améliorer leur filtrabilité.

méthode de Nelson

3. Principe

Les polygalacturonases coupent les chaînes de pectines de faible degré de méthylation et libèrent ainsi les acides galacturoniques constitutifs de la pectine situés aux extrémités de la chaîne. Une fois libérées, les acides galacturoniques sont dosés par la méthode de Nelson (1994). En milieu alcalin, le groupement pseudoaldéhydique des sucres réduit les ions cuivriques Cu^{2+}. Ces derniers réagissent avec le réactif arséniomolybdique en donnant une coloration bleue dont l'absorbance, mesurée à 520 nm, varie de manière linéaire avec la concentration en oses (entre 0 et 250 µg/mL).

4. Appareillage

4.1 agitateur magnétique chauffant
4.2 bain d'eau à 40°C
4.3 bain d'eau à 100°C
4.4 vase cylindrique de 100 mL
4.5 centrifugeuse pouvant recevoir des tubes en verre de 15 mL
4.6 chronomètre
4.7 fiole jaugée de 100 mL
4.7.1. fiole jaugée de 500 mL
4.8 seringue de précision 200 µL
4.8.1 seringue de précision 1 mL
4.9 pipette droite de 10 mL graduée au $1/10^{e}$ de mL
4.10 spectrophotomètre
4.11 tubes en verre de 15 mL
4.12 agitateur de type vortex
4.13 flacon en verre brun de 500 mL.
4.14 chambre à 4°C
4.15 étuve à 37°C
4.16 coton cardé
4.17 papier Kraft
4.18 pH mètre
4.19 portoir métallique pour tubes de 15 mL
4.20 cuves de 1 cm de parcours optique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible

5. Produits

5.1 acétate de sodium (CH_3COONa pur à 99% - PM = 82g/mole)
5.2 acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM = 60 g/mole, densité = 1,058)

5.3 acide polygalacturonique pur à 85%. Il s'agit de "Polygalacturonic acid sodium salt" from citrus fruit (Sigma, P3850) à titre d'exemple.
5.4 sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4 pur à 99,5% - PM = 142 g/mole)
5.5 carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM = 105,99 g/mole)
5.6 tartrate de potassium et de sodium ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ pur à 99% - PM = 282,2 g/mole)
5.7 hydrogénocarbonate de sodium anhydre ($NaHCO_3$ pur à 98% - PM = 84,01 g/mole)
5.8 sulfate de cuivre penta-hydraté ($CuSO_4.5H_2O$ pur à 99% - PM = 249,68 g/mole)
5.9 acide sulfurique (H_2SO_4 pur à 98%) concentré
5.10 heptamolybdate d'ammonium ($(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$ pur à 99% - PM = 1235,86 g/mole)
5.11 hydrogénoarséniate de sodium ($Na_2HAsO_4.7H_2O$ pur à 98,5% - PM = 312,02 g/mole). **Compte tenu de la toxicité de ce produit, une attention particulière doit être portée lors de sa manipulation. Les déchets doivent être traités de manière appropriée.**
5.12 acide D-galacturonique ($C_5H_{10}O_7.H_2O$ - PM : 212,16 g/mole)
5.13 eau distillée
5.14 préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1 Réactifs de la solution oxydante
Ces réactifs devront être préparés en premier, compte-tenu du délai de 24 heures pour la solution D.

6.1.1 Solution A : Placer dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) successivement
20 g de sulfate de sodium anhydre (5.4)
2,5 g de carbonate de sodium anhydre (5.5)
2,5 g de tartrate de potassium et de sodium (5.6)
2 g de hydrogénocarbonate de sodium anhydre (5.7)

Dissoudre dans 80 mL d'eau distillée (5.13). Chauffer (4.1) jusqu'à dissolution et transvaser dans une fiole de 100 mL (4.7). Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée (5.13).
Conserver à 37 °C (4.15) ; s'il se forme un dépôt : filtrer sur filtre plissé.

6.1.2 Solution B :
Dissoudre 15 g de sulfate de cuivre hydraté (5.8) dans 100 mL d'eau distillée (5.13) et ajouter une goutte d'acide sulfurique concentré (5.9). Conserver à 4°C.

6.1.3 Solution C :
Cette solution est préparée extemporanément pour avoir une bonne proportionnalité entre la densité de couleur et la quantité de glucose en mélangeant 1 mL de solution B (6.1.2) avec 24 mL de solution A (6.1.1).

6.1.4 Solution D :
Dans une fiole jaugée de 500 mL (4.7.1), dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium (5.10) dans 400 mL d'eau (5.13). Ajouter 25 mL d'acide sulfurique concentré (5.9) (refroidi sous courant d'eau froide).

Dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) dissoudre 3 g d'arséniate de sodium (5.11) dans 25 mL d'eau (5.13) et transvaser quantitativement dans la fiole jaugée de 500 mL (4.7.1) contenant le molybdate d'ammonium (5.10).

Compléter avec de l'eau (5.13) pour avoir un volume final de 500 mL.

Placer à 37°C (4.15) pendant 24 heures puis conserver à 4°C (4.14) dans un flacon en verre brun de 500 mL (4.13).

6.2 Tampon acétate de sodium (pH 4,2, 100 mM)
Il est constitué des solutions A et B.
6.2.1 Solution A : acétate de sodium 0,1 M : dissoudre 0,5 g d' acétate de sodium (5.1) dans 60 mL d'eau distillée (5.13)
6.2.2 Solution B : acide acétique 0,1 M : étendre 1 mL d'acide acétique (5.2) par 175 mL d'eau distillée (5.13)
6.2.3 Préparation du Tampon acétate de sodium : mélanger 23,9 mL de solution A (6.2.1) + 76,1 mL de solution B (6.2.2).
Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.18).

La solution doit être conservée à 4°C (4.14).

6.3 Solution d'acide polygalacturonique à 0,4 % (p/v)
Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7) dissoudre 0,4 g d'acide polygalacturonique (5.3) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.2).
La solution doit être préparée extemporanément.

6.4 Solution mère d'acide D-galacturonique à 250 µg/mL
Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), dissoudre 0,0250 g d'acide D-galacturonique (5.12) dans de l'eau distillée (5.13) en complétant à 100 mL.

7. Préparation de la gamme étalon d'acide D-galacturonique

La gamme étalon est réalisée de 0 à 250 µg/mL, selon le tableau 1.

Tableau 1 : gamme étalon d'acide D-galacturonique

Acide galacturonique (µg/mL)	0	25	50	100	150	200	250
Acide galacturonique (µmole/mL)	0	0,118	0,236	0,471	0,707	0,943	1,178
Vol (µL) solution mère (6.4)	0	100	200	400	600	800	1000
Vol (µL) eau distillée (5.13)	1000	900	800	600	400	200	0

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés au moment de l'utilisation.

8.1 Solution enzymatique à 1 g/l à préparer extemporanément
Placer 100 mg de préparation commerciale (5.14) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), compléter avec de l'eau distillée (5.13), agiter afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2 Blanc dénaturé par chauffage à préparer extemporanément
Placer 10 mL de la solution enzymatique à 1 g/l (8.1) dans un tube de 15 mL (4.11), boucher avec du coton cardé (4.16) recouvert de papier Kraft (4.17) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3). Puis refroidir et centrifuger pendant 5 min à 6 500 g.

9. Mode opératoire

9.1 Cinétique enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.
Dans 5 tubes de 15 mL (4.11) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.19) dans un bain d'eau à 40°C, introduire
200 µL de la solution enzymatique à 1 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8),
400 µL d'eau distillée (5.13), à l'aide de la seringue de précision (4.8.1),
600 µL d'acide polygalacturonique (6.3) préalablement portée à 40°C dans le bain d'eau, enclencher le chronomètre (4.6)

Après agitation (4.12), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.16) et du papier Kraft (4.17) sont replacés dans le bain d'eau à 40 °C (4.2)
durant 1 mn pour le tube n°1
durant 2 mn pour le tube n°2
durant 5 mn pour le tube n°3
durant 10 mn pour le tube n°4
durant 15 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 40°C, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.
Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

Note : le point de cinétique à 10 min permet d'évaluer l'activité enzymatique recherchée.

9.2 Dosage des substances réductrices libérées

Dans un tube de 15 mL (4.11)
placer 1 mL du milieu réactionnel (9.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8.3)
ajouter 1 mL de solution C (6.1.3), à l'aide de la seringue de précision (4.8.3), après agitation (4.12), le tube est placé dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.
Le tube est ensuite refroidi sous courant d'eau froide.
ajouter 1 mL de la solution D (6.1.4)
ajouter 9,5 mL d'eau (5.13) à l'aide de la pipette droite de 10 mL (4.9)
attendre 10 mn pour la stabilisation de la couleur.
Centrifuger (4.5) chacun des tubes à 2430 g durant 10 mn.
Placer le surnageant dans une cuve (4.20).
Réaliser le zéro du spectrophotomètre avec de l'eau distillée.Mesurer aussitôt l'absorbance à 520 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.10).

9.3 Blancs
Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 1 g/l (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). Pour chaque point de cinétique, la réaction enzymatique de chaque blanc est réalisée en même temps que celle de la solution enzymatique.

9.4 Gamme étalon
Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon d'acide D-galacturonique de 0 à 250 µg/mL (7).

10. Calculs

10.1 Réalisation d'une cinétique
De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

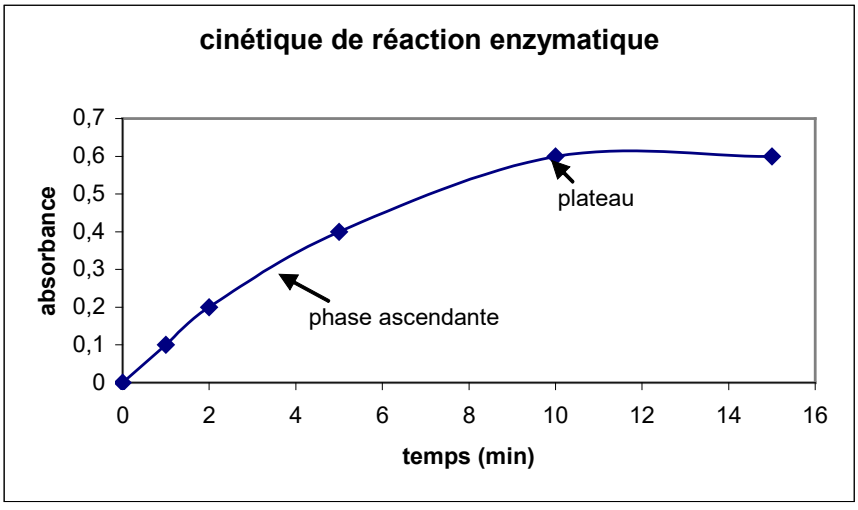


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 12 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min, T=15 min.

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2 Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme étalon d'acide D-galacturonique (de 0 à 0,589 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente de la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3 Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 mn pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q d'acide D-galacturonique libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

La formule pour calculer l'activité enzymatique en U/g de préparation est la suivante :

$$\text{Activité en U/g} = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

Avec Q : quantité d'acide D-galacturonique formé en µmoles pendant un temps T (min)

V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,2 mL

C : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 1 g/l

Ensuite, il est possible d'exprimer l'activité enzymatique en nanokatal. Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde dans les conditions définies par les protocoles de dosages et donc :

$$\text{Activité en nkat/g} = (\text{activité en U /g }) \times (1000/60)$$

11. Caractéristiques de la méthode

r	0,084
R	0,056
Sr	0,03
SR	0,02

La répétabilité intralaboratoires de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la polygalacturonase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,03 avec un pourcentage d'erreur de 3,78. Le % d'erreur correspondant à :

$$\frac{\text{(moyenne des écarts-types des valeurs x 100)}}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité intralaboratoires ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non ». Cette analyse de variance donne un écart type de reproductibilité de 0,02.
- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.

Si la puissance est faible ($\cong$ 20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.

Si la puissance est élevée ($\cong$ 80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2:

Dosages	Hypothèses de l'analyse de variance	Probabilité	Puissance de l'essai (α = 5%)	Test Newman-Keuls (*)	Test Bonferroni (**)
PG	Interaction traitement* blocs	0,0256	77%	Significatif	Significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi

** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t (t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%.

12. Références bibliographiques

NELSON N., A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose. The may Institute for medical research of the Jewish hospital, 1944. p 375-380.

Activités enzymatiques et leurs mesures – OIV Document, FV 1226, 2005

Détermination de l'activité polygalacturonase avec le cyanoacétamide

1. Principe

Les polygalacturonases coupent les chaînes principales des pectines (zone homogalacturanane) présentant un faible degré de méthylation. Cette activité enzymatique conduit à la libération dans le milieu d'acides galacturoniques ainsi que des oligomères d'homogalacturananes. Des extrémités à réactivités réductrices sont par conséquent libérées. Cette méthode, recourant aux ultraviolets et au cyanoacétamide et qui repose sur la réaction de KNOEVENAGEL, à savoir la condensation entre un groupe méthylène actif et un groupe carbonyle dans un milieu fortement alcalin, permet de déterminer l'activité de diverses enzymes parmi lesquelles la polygalacturonase. Elle a été développée pour déterminer la dégradation enzymatique à mécanisme endo et exo de polysaccharides générant des oses réducteurs.

2. Équipement et matériel

- spectrophotomètre
- Cuvette en quartz (λ=274 nm, parcours optique 1 cm)
- balance analytique
- agitateur magnétique et barre d'agitation
- bain d'eau (40 °C ; 100 °C)
- chronomètre
- fioles jaugées (différents volumes)
- béchers (différents volumes)
- pipettes de précision (différents volumes)
- spectrophotomètre
- tubes de verre (pouvant être fermés)
- agitateur vortex

3. Produits chimiques et réactifs

- acide polygalacturonique ~95 % enzymatique (CAS-25990-10-7)
- tampon pH 4,0 Na-citrate/HCl, 1,06 g/cm^3 (Titrisol), qualité p.a.
- tampon pH 9,0 H_3BO_3/KCl/NaOH ≈0,05 M/≈0,05 M/≈0,022 M, (Titrisol), qualité p.a
- cyanoacétamide, ≥98%, purum (CAS-107-91-5)
- Acide D-galacturonique monohydrate ≥97,0% (CAS-91510-62-02)

4. Préparation des solutions

4.1. Solution mère d'acide D-galacturonique monohydrate (250 µg/mL)

Dissoudre 0,025 g d'acide D-galacturonique monohydrate dans 100 mL de H_2O.

4.2. Solution de cyanoacétamide à 1 %

Dissoudre 1 g de cyanoacétamide dans 100 mL de H_2O

4.3. Tampon borate (pH 9,0)

Cette solution prête à l'emploi doit être diluée conformément à la description du producteur.

4.4. Tampon Na-citrate/HCl (pH 4,0)

Cette solution prête à l'emploi doit être diluée conformément à la description du producteur.

4.5. Solution d'acide polygalacturonique

En agitant sans interruption, dissoudre très lentement l'acide polygalacturonique dans le tampon Na-citrate/HCl (pH 4.0.) à raison de 5 g/l.

5. Performance de la détermination de l'activité enzymatique

5.1. Courbe et procédure d'étalonnage

La gamme d'étalonnage va de 0 µg/mL à 250 µg/mL d'acide D-galacturonique. Utiliser la solution mère pour la dilution.

acide D-galacturonique monohydrate en µg/mL	0	25	50	100	150	200	250
acide D-galacturonique monohydrate en µmol/mL	0	0,118	0,236	0,471	0,707	0,943	1,178
solution mère en µL	0	100	200	400	600	800	1000
H_2O en µL	1000	900	800	600	400	200	0

Analyse au cyanoacétamide : mélanger 1 mL d'acide D-galacturonique avec 2 mL de tampon borate (pH 9) et 1 mL de solution de cyanoacétamide à 1 %. Après 10 minutes d'incubation dans un tube à essai à 100 °C, refroidir la solution dans un bain

d'eau froide. Puis mesurer immédiatement l'absorbance à 274 nm. Le photomètre doit être réglé sur zéro avec de l'eau.

Pour le calcul, le point d'intersection de la ligne de régression doit être réglé sur zéro.

5.2. Hydrolyse enzymatique et procédure de l'échantillon

Pour l'hydrolyse enzymatique de l'acide polygalacturonique, chauffer 10 mL de solution d'acide polygalacturonique à 40 °C dans un tube en verre pouvant être fermé. Ajouter ensuite 0,01 g de l'échantillon et incuber le mélange à 40 °C. Après exactement 5 min, puis exactement 10 min, prélever 500 µl de mélange réactionnel et porter directement jusqu'à 100 °C dans des tubes à essai préchauffés pendant 10 min. Diluer ensuite ces 500 µl avec de l'eau jusqu'à un volume total de 25 mL.

Pour analyser le blanc, chauffer la même concentration d'enzyme dans l'acide polygalacturonique jusqu'à 100 °C pendant 10 min (la solution d'acide polygalacturonique doit être chauffée à 100 °C avant d'ajouter l'enzyme !). En cas de turbidité, centrifuger la solution à 5 000 rpm pendant 5 min. Incuber ensuite aussi le blanc à 40 °C. Prélever 500 µl de blanc après 5 min et les placer également dans le bain d'eau à 100 °C pendant 10 min. Diluer ensuite ces 500 µl avec de l'eau jusqu'à un volume total de 25 mL.

Analyse au cyanoacétamide : ajouter 1mL de la solution diluée et 1 mL de solution de cyanoacétamide à 1 % à 2 mL de tampon borate (4.3.). Après incubation pendant 10 min dans un tube à essai à 100 °C, refroidir la solution dans un bain d'eau froide. Mesurer ensuite immédiatement l'absorbance à 274 nm.

6. Calcul de l'activité enzymatique

Calculer l'activité enzymatique en rapportant la valeur d'absorbance à la quantité de produit généré avec une gamme standard, à l'aide de la formule suivante :

Activité (U/g) = q / (t*c*F)
Activité (nkat/g) = q / (t*c*F)* 1000/60

q = quantité d'acide galacturonique en µmol/mL
t = temps en min

c = concentration de la solution enzymatique en g/L (= 0,01 g/L) pour 10 mL de substrat
F = facteur de correction du volume (= 2)

7. Bibliographie

Bach E. et Schollmeyer E. (1992) : Méthode de spectrophotométrie dans l'ultraviolet avec du 2-cyanoacétamide pour la détermination de la dégradation enzymatique des polysaccharides réducteurs. Anal. Biochem. 203, 335-339

8. Validation intra laboratoire de la détermination de l'activité polygalacturonase avec le 2-cyanoacétamide

La valeur moyenne de l'écart type a été déterminée pour 6 enzymes.

Chaque enzyme a été analysée 6 fois.

La valeur moyenne des écarts types pour les différents enzymes = 6,93 %

	Enzyme 1 5 min	Enzyme 2 5 min	Enzyme 3 5 min	Enzyme 4 5 min	Enzyme 5 5 min	Enzyme 6 5 min	Enzyme 4 10 min	Enzyme 5 10 min	Enzyme 6 10 min
Valeur moyenne (nkat/g)	7583,9	3896,4	10445,8	8751,7	16894,4	16153,1	8532,5	11608,9	14436,1
Écart type (nkat/g)	1195,6	367,1	445,3	420,4	631,4	908,7	246,48	656,3	1012,3
Écart type %	15,8	9,4	4,3	4,8	3,7	5,6	2,9	5,7	7,0
$s^2(r)$	1191221	112292	165238	147264	332227	688096	50628	358948	853983
s (r)	1091,4	335,1	406,5	383,7	576,4	829,5	225,0	599,1	924,1
Répétabilité r (nkat/g)	3088,7	948,3	1150,4	1086,0	1631,2	2347,5	636,8	1695,5	2615,2

Validation intra laboratoire de la détermination de l'activité PG avec le 2-cyanoacétamide

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 1	0,1698	0,01	389,2	6487
Enzyme 1	0,2278	0,01	593,6	9893
Enzyme 1	0,1855	0,01	444,5	7408
Enzyme 1	0,1815	0,01	430,4	7173
Enzyme 1	0,1887	0,01	455,9	7598
Enzyme 1	0,1776	0,01	416,6	6943

Enzyme 1; 5 min	
valeur moyenne (nkat/g)	7583,9
écart type (nkat/g)	1195,60
écart type %	15,77
Variance	248,5
$s^2(r)$	1191221,0
s(r)	1091,4
répétabilité r (nkat/g)	3088,7

	(X-MW)^2
	1203896,6
	5333533,6
	30819,8
	168555,9
	208,6
	410311,4
total	7147325,9

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 2	0,0898	0,01	215,2	3587
Enzyme 2	0,0898	0,01	215,3	3588
Enzyme 2	0,0897	0,01	214,5	3575
Enzyme 2	0,09	0,01	245,2	4087
Enzyme 2	0,0954	0,01	245,6	4093
Enzyme 2	0,0971	0,01	266,9	4448

Enzyme 2; 5 min	
valeur moyenne (nkat/g)	3896,4
écart type (nkat/g)	367,08
écart type %	9,42
Variance	88,76
$s^2(r)$	112292,05
s(r)	335,10
répétabilité r (nkat/g)	948,33

(X-MW)^2
95927,9
94898,2
103290,8
36205,6
38787,1
304642,7
total 673752,3

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 3	0,4077	0,01	613,4	10223
Enzyme 3	0,3937	0,01	588,8	9813
Enzyme 3	0,4201	0,01	635,3	10588
Enzyme 3	0,4095	0,01	616,6	10277
Enzyme 3	0,4381	0,01	666,9	11115
Enzyme 3	0,4225	0,01	639,5	10658

Enzyme 3; 5 min	
valeur moyenne (nkat/g)	10445,83
écart type (nkat/g)	445,29
écart type %	4,26
Variance	18,2
$s^2(r)$	165237,7
s(r)	406,5
répétabilité r (nkat/g)	1150,4

(X-MW)^2
49506,3
400056,3
20306,3
28617,4
447784,0
45156,3
total 991426,4

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 4	0,2032	0,01	530,4	8840
Enzyme 4	0,19614	0,01	505,5	8425
Enzyme 4	0,21	0,01	555,9	9265
Enzyme 4	0,19188	0,01	490,5	8175
Enzyme 4	0,20858	0,01	549,3	9155
Enzyme 4	0,3448	0,01	519	8650

Enzyme 4; 5 min	
valeur moyenne (nkat/g)	8751,7
écart type (nkat/g)	420,38
écart type %	4,80
Variance	23,1
$s^2(r)$	147263,9
s(r)	383,7
répétabilité r (nkat/g)	1086,0

(X-MW)^2
7802,8
106711,1
263511,1
332544,4
162677,8
10336,1
total 883583,3

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 5	0,35063	0,01	978,1	16302
Enzyme 5	0,35329	0,01	987,5	16458
Enzyme 5	0,3812	0,01	1085,7	18095
Enzyme 5	0,35979	0,01	1010,4	16840
Enzyme 5	0,35941	0,01	1009,1	16818
Enzyme 5	0,4559	0,01	1011,2	16853

Enzyme 5; 5 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	16894,4		351385,5
écart type (nkat/g)	631,40		190192,9
écart type %	3,74		1441333,6
Variance	14,0		2964,2
$s^2(r)$	332226,5		5792,9
s(r)	576,4		1690,1
répétabilité r (nkat/g)	1631,2	total	1993359,3

Enzyme	Absorbance 5 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 6	0,30006	0,01	888,5	14808
Enzyme 6	0,3108	0,01	926,2	15437
Enzyme 6	0,3348	0,01	1010,9	16848
Enzyme 6	0,3391	0,01	1025,9	17098
Enzyme 6	0,3195	0,01	957	15950
Enzyme 6	0,5370	0,01	1006,6	16777

Enzyme 6; 5 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	16153,1		1808277,9
écart type (nkat/g)	908,69		513213,0
écart type %	5,63		483411,2
Variance	31,6		893550,1
$s^2(r)$	688095,8		41231,6
s(r)	829,5		388890,8
répétabilité r (nkat/g)	2347,5	total	4128574,5

Enzyme	Absorbance 10 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 4	0,3355	0,01	498	8300
Enzyme 4	0,3569	0,01	535,8	8930
Enzyme 4	0,3340	0,01	495,4	8257
Enzyme 4	0,3420	0,01	509,5	8492
Enzyme 4	0,3472	0,01	518,6	8643
Enzyme 4	0,3448	0,01	514,4	8573

Enzyme 4; 10 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	8532,5		54056,3
écart type (nkat/g)	246,48		158006,3
écart type %	2,89		76084,0
Variance	8,3		1667,4
$s^2(r)$	50627,5		12284,0
s(r)	225,0		1667,4
répétabilité r (nkat/g)	636,8	total	303765,3

Enzyme	Absorbance 10 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 5	0,43542	0,01	638,3	10638
Enzyme 5	0,49384	0,01	741,2	12353
Enzyme 5	0,4712	0,01	701,4	11690
Enzyme 5	0,49213	0,01	738,2	12303
Enzyme 5	0,46232	0,01	685,7	11428
Enzyme 5	0,4559	0,01	674,4	11240

Enzyme 5; 10 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	11608,9		941978,1
écart type (nkat/g)	656,31		554197,5
écart type %	5,65		6579,0
Variance	32,0		482253,1
$s^2(r)$	358947,8		32600,3
s(r)	599,1		136079,0
répétabilité r (nkat/g)	1695,5	total	2153687,0

Enzyme	Absorbance 10 min	Concentration (mg/ml)	U/g	nkat/g
Enzyme 6	0,60886	0,01	987,9	16465
Enzyme 6	0,5221	0,01	835,1	13918
Enzyme 6	0,5180	0,01	828,0	13800
Enzyme 6	0,52344	0,01	837,5	13958
Enzyme 6	0,52895	0,01	847,2	14120
Enzyme 6	0,537	0,01	861,3	14355

Enzyme 6; 10 min			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	14436,1		4116390,1
écart type (nkat/g)	1012,31		268093,8
écart type %	7,01		404637,3
Variance	49,2		228271,6
$s^2(r)$	853983,0		99926,2
s(r)	924,1		6579,0
répétabilité r (nkat/g)	2615,2	total	5123898,1

valeur moyenne des écarts types %	**6,93**

ÉVALUATION COMPARATIVE DE L'ACTIVITÉ PROTÉASE (ASPERGILLOPEPSINE I) DANS LES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES EC 3.4.23.18 (Oeno 625-2021)

1. ORIGINE

Les préparations enzymatiques contenant une activité Aspergillopepsine I sont produites par fermentation contrôlée d'*Aspergillus* spp., *Aspergillus niger* en particulier.

Cette enzyme est communément désignée comme Aspergillopepsine I ou protéase acide d'Aspergillus (EC 3.4.23.18). Les protéases sont généralement présentes au sein de complexes enzymatiques. Sauf indication contraire, les spécifications de la résolution OENO 365-2009 doivent être conformes aux spécifications générales des préparations enzymatiques du *Codex œnologique international*.

Référence est faite au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Référence est faite au *Code international des pratiques œnologiques* et aux résolutions OIV-OENO 541A-2021 et OIV-OENO 541B-2021.

Les préparations enzymatiques ayant des activités protéases (Aspergillopepsine I) sont susceptibles de dégrader les protéines natives du moût ou du vin dans des conditions spécifiques de chauffage. Ces protéines posent des difficultés majeures lors des étapes de stabilisation des moûts et des vins. Ces protéases sont donc utilisées spécifiquement pour la clarification et la stabilisation des moûts et des vins riches en protéines.

Pour vérifier que le traitement a conduit à l'élimination des protéases (Aspergillopepsine I) et à la réduction de la teneur en protéines natives, les protéines contenues dans les vins finis peuvent être analysées au moyen de la méthode SDS-PAGE décrite en annexe I de la présente monographie.

3. PRINCIPE

Cette procédure est uniquement destinée à rendre compte du niveau d'activité protéase des préparations enzymatiques, exprimée en unités spectrophotométriques d'acide protéase (SAP), des préparations dérivées de, par exemple, *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*. L'essai est basé sur une hydrolyse enzymatique de 30 min d'un substrat de caséine (Hammarsten) à pH 3,0 et 37 °C. Le substrat non hydrolysé est précipité avec de l'acide trichloroacétique et extrait par filtration. La quantité de caséine solubilisée dans le filtrat est déterminée par spectrophotométrie (source : Codex des produits chimiques alimentaires - FCC).

4. RÉACTIFS ET SOLUTIONS

4.1. Caséine : utiliser de la caséine selon Hammarsten (n° CAS : 9000-71-9, par ex. réf. produit Merck : 102242)

4.2. Tampon acide chlorhydrique-glycine (0,05 M) : dissoudre 3,75 g de glycine dans environ 800 mL d'eau. Additionner de l'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à obtenir un pH 3,0, déterminé par un pHmètre. Transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1000 mL, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter.

4.3. Solution de TCA : dissoudre 18,0 g d'acide trichloroacétique et 11,45 g d'acétate de sodium anhydre dans environ 800 mL d'eau, et additionner 21,0 mL d'acide acétique glacial. Transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1000 mL, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter.

4.4. Solution substrat : introduire 8 mL d'acide chlorhydrique 1 M avec une pipette dans 500 mL d'eau, puis disperser 7,0 g (à l'état sec) de caséine (4.1) dans cette solution en agitant en continu. Chauffer 30 min dans un bain d'eau à ébullition, agiter occasionnellement, puis refroidir à température ambiante. Dissoudre 3,75 g de glycine dans la solution, et ajuster à pH 3,0 avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M en utilisant un pHmètre. Transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1000 mL, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- Peser la préparation enzymatique, la transvaser quantitativement dans un mortier de verre, et triturer avec le tampon acide chlorhydrique-glycine (4.2).

- Transvaser quantitativement le mélange dans une fiole jaugée d'un volume approprié, porter au trait de jauge avec le tampon acide-chlorhydrique-glycine (4.2) et agiter.

La solution de la préparation enzymatique échantillon doit être préparée de manière à ce que 2 mL de la dilution finale donne une absorbance corrigée (entre 0,200 et 0,500) du filtrat de la solution enzymatique incubée à 275 nm (A, tel que défini dans le mode opératoire).

6. MODE OPÉRATOIRE

- Introduire 10,0 mL de la solution substrat (4.4) avec une pipette dans une série de tubes à essai de 25 × 150 mm, en prévoyant au moins deux tubes pour chaque échantillon, un pour chaque blanc d'enzymes et un pour un blanc de substrat.
- Boucher les tubes, et les équilibrer 15 min dans un bain d'eau maintenu à 37 ± 0,1 °C.
- Au temps zéro, lancer le chronomètre et transférer rapidement avec une pipette 2,0 mL de la préparation échantillon dans le substrat équilibré.
- Mélanger en tournoyant et replacer les tubes dans le bain d'eau (Remarque : Les tubes doivent être bouchés pendant l'incubation).
- Additionner 2 mL de tampon acide chlorhydrique-glycine (au lieu de la préparation échantillon) au blanc de substrat.
- Après exactement 30 min, additionner 10 mL de solution de TCA (4.3) à chaque solution enzymatique incubée et au blanc de substrat afin d'arrêter la réaction. (Attention : Ne pas procéder à un pipetage à la bouche pour le TCA).
- Préparer dans cet ordre un blanc d'enzyme contenant 10 mL de solution substrat, 10 mL de solution de TCA et 2 mL de préparation échantillon.
- Chauffer tous les tubes dans le bain d'eau pendant 30 min afin de permettre la coagulation complète des protéines précipitées.
- À la fin de la deuxième période de chauffage, refroidir les tubes dans un bain de glace pendant 5 min, puis filtrer au travers d'un papier filtre Whatman grade 42 ou équivalent. Les filtrats doivent être parfaitement clairs.
- Déterminer l'absorbance de chaque filtrat par rapport au blanc de substrat dans une cellule de 1 cm à 275 nm avec un spectrophotomètre adapté. Corriger chaque absorbance en soustrayant l'absorbance des blancs d'enzymes respectifs.

6.1. Courbe étalon

- Transvaser 181,2 mg de L-tyrosine, de classe chromatographique ou équivalent (n° CAS : 60-18-4, par ex. réf. produit Merck : 108371), préalablement séchés jusqu'à poids constant, dans une fiole jaugée de 1000 mL.
- Dissoudre dans 60 mL d'acide chlorhydrique 0,1 M.
- Après dissolution complète, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter soigneusement. Cette solution contient 1,00 µmol/mL de tyrosine.
- Préparer des dilutions de cette solution mère, contenant 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 et 0,50 µmol/mL.
- Déterminer l'absorbance de chaque dilution par rapport au blanc d'eau dans une cellule de 1 cm à 275 nm.
- Préparer une courbe d'absorbance en fonction de la concentration en tyrosine en µmol/mL. La courbe obtenue doit être une ligne droite.

Déterminer la pente et l'ordonnée à l'origine afin de les employer dans les calculs ci-après. La valeur obtenue pour la pente devrait être proche de 1,38. La pente et l'ordonnée à l'origine peuvent être calculées par la méthode des plus petits carrés de la manière suivante :

$$\text{Pente} = [n\Sigma(MA) - \Sigma(M)\Sigma A] / [n\Sigma(M^2) - (\Sigma M)^2]$$
$$\text{Ordonnée à l'origine} = [\Sigma(A)\Sigma(M)^2 - \Sigma(M)\Sigma(MA)] / [n\Sigma(M^2) - (\Sigma M)^2]$$

où *n* est le nombre de points de la courbe étalon, M la concentration en tyrosine en µmol/ L pour chaque point de la courbe étalon, et A l'absorbance de l'échantillon.

6.2. Calculs

Une unité spectrophotométrique d'acide protéase correspond à l'activité nécessaire à la libération de 1 µmol de tyrosine par min sous les conditions spécifiées. L'activité est exprimée de la manière suivante :

$$\mathbf{SAP/g = (A - O) \times 22 / (P \times 30 \times M)}$$

où :
A est l'absorbance corrigée du filtrat de la solution enzymatique incubée,
O est l'ordonnée à l'origine de la courbe étalon,
22 est le volume final du mélange incubé, en mL,
P est la pente de la courbe étalon,
30 est le temps d'incubation, en min, et

M est la masse en g de l'échantillon d'enzymes contenu dans l'aliquote de 2,0 mL de la préparation échantillon additionnée au mélange d'incubation au cours du mode opératoire.

Annexe I
Analyse des protéines par méthode SDS-PAGE

1. PRINCIPE

L'essai est basé sur la méthode Bradford modifiée (Marchal et al., 1997 ; Marchal *et al.*, 1996) combinée à une électrophorèse SDS-PAGE.

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford, en utilisant une ultrafiltration à 3 kDa de manière à réduire les interférences causées par l'éthanol et les composés phénoliques (Marchal *et al.*, 1996), et une électrophorèse SDS-PAGE (dodécylsulfate de sodium-gel de polyacrylamide) destinée à séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire (Laemmli, 1970).

2. MODE OPÉRATOIRE

- Soumettre les échantillons (vins avant traitement, vins venant d'être additionnés d'Aspergillopepsine I et vins après traitement) à une ultrafiltration avec des filtres centrifuges de 3 kDa (par ex. : Amicon® Ultra-4, Merck Millipore, Irlande) à 4500g pendant 20 minutes et à 18 °C. Collecter l'ultrafiltrat.
- Additionner 400 µL d'eau ultra-pure à 400 µL d'échantillon (vin ou ultrafiltrat) et 200 µL de réactif de Bradford (Bio-Rad, États-Unis) dans une cuvette semi-micro (trajet optique de 10 mm).
- Mélanger la solution deux fois et mesurer l'absorbance à 595 nm après 30 minutes en comparaison à l'eau ultra-pure.

Pour obtenir l'absorbance des protéines (A_P), déduire l'absorbance de l'ultrafiltrat (A_{UF}) de celle du vin (A_V)

$$A_P = A_V - A_{UF}$$

Élaborer une courbe d'étalonnage avec cinq concentrations (de 0 à 20 mg/L) d'ASB (albumine de sérum bovin) en mesurant l'absorbance après 10 minutes de réaction. La teneur totale en protéines est calculée en mg/L éq. ASB, comme la valeur moyenne de trois mesures différentes.

Utiliser des gels de polyacrylamide à 4 % pour le gel de concentration et 13 % pour le gel de résolution (composition : **tableau 1**).

Mélanger les échantillons avec le tampon Laemmli quatre fois (trois volumes

d'échantillon + un volume de tampon ; BioRad, États-Unis) et les analyser par SDS-PAGE. Utiliser comme étalons des marqueurs d'entre 10 et 250 kDa (Precision Plus Protein TM Unstained Standards, Bio-Rad, États-Unis). Procéder aux analyses en triple.

Tableau 1. Composition des gels de résolution et de concentration (pour 4 gels)

Composition	**Gel de résolution (13 %)**	**Gel de concentration (4 %)**
Eau ultra-pure	6,2 mL	4,88 mL
Bis-acrylamide (30 %)	8,6 mL	1,04 mL
Tampon tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	5,0 mL	-
Tampon tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	-	2,0 mL
Dodécylsulfate de sodium (SDS) 10 %	0,2 mL	80 µL
Persulfate d'ammonium (APS) 10 %	100 µL	40 µL
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	20 µL	8 µL

Introduire les gels dans un système d'électrophorèse vertical (par ex. : Mini-PROTEAN III ; Bio-Rad, États-Unis) à température ambiante et colorés au bleu de Coomassie R250.
Après migration, colorer les gels avec du nitrate d'argent à température ambiante (Rabilloud, 1994) en suivant les indications du **tableau 2**.

Tableau 2. Protocole de coloration argentique des gels de SDS-PAGE

Étape	**Solution : concentration finale**	**Temps**
Fixation	Éthanol 99 % : 30% *(v/v)* Acide acétique : 10 % *(v/v)*	Une nuit
Sensibilisation	Éthanol 99 % : 20 % *(v/v)* Acétate de potassium : 0,5 M Tétrathionate de potassium : 3 g/L Glutaraldéhyde 50 % : 1 % *(v/v)*	2 h 30 min (à l'obscurité)
Lavage	Eau ultra-pure	3 x 20 min
Coloration	Nitrate d'argent : 2 g/L Formaldéhyde 37 %: 0,7 mL/L	30 min
Lavage	Eau ultra-pure	15 s
Développement	Carbonate de potassium : 30 g/L Formaldéhyde 37 % : 0,5 mL/L Thiosulfate de sodium, $5H_2O$ 2,48 g/L : 3,75 mL/L	5 min
Arrêt	Tris : 50 g/L Acide acétique : 25 mL/L	5 min

3. RÉSULTATS

La masse moléculaire des chitinases et des TLP (protéines thaumatin-like) est inférieure à 15 kDa et celle des protéases est proche de 40 kDa. Une analyse visuelle des gels permet une première observation des protéines résiduelles. Des résultats plus précis sont obtenus en numérisant les gels de SDS-PAGE et en les analysant avec un logiciel spécifique.

4. BIBLIOGRAPHIE

Marchal R., Seguin V. et Maujean A. Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the Champagne region using the Bradford method. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1997, 48, 303-309.

Marchal R., Bouquelet S. et Maujean A. Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a Champenois Chardonnay wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 1716-1722.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE PECTINE MEHTYL ESTERASE DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

(activité Pectine Méthyl-Estérase) (PME)

(EC 3.1.1.11 – CAS n° 9025-98-3)

(Oeno 9/2008 ; Oeno 363-2012)

Spécifications générales

Ces enzymes sont généralement présentes au sein d'une préparation enzymatique complexe. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution OENO 365-2009 relative aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques figurant dans le Codex œnologique international.

1. Origine et application oenologique

On se reportera au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées, comme par exemple, *d'Aspergillus niger*, d'*Aspergillus oryzae, d'Aspergillus sojae, Aspergillus Tubigensis, Aspergillus Awamori, de Rhizopus oryzae et de Trichoderma longibrachiatum (T. reesei)*

2. Objet / Applications

On se reportera au Code international des pratiques œnologiques, OENO 11/04 ; 12/04 ; 13/04 ; 14/04 et 15/04.

Ces activités d'enzymes sont utilisées pour faciliter la macération du raisin et l'extraction du jus de raisin et pour aider à la clarification des moûts et des vins et enfin pour améliorer leur filtrabilité.

Détermination de l'activité pectine méthyl estérase par dosage du méthanol

3. Principe

Il s'agit d'une activité de déméthylation de la pectine qui entraîne l'apparition de groupements carboxyliques libres au niveau des acides galacturoniques constitutifs des chaînes.
L'activité Pectine Méthyl-Estérase est estimée par dosage du méthanol selon la méthode de Klavons & Bennet (1986). L'alcool oxydase de *Pichia pastoris* est spécifique des alcools primaires de faible masse molaire et catalyse l'oxydation du méthanol en formaldéhyde. La pentane-2,4-dione se condense exclusivement avec des aldéhydes de faible poids moléculaire tel le formaldéhyde en formant un composé chromophore absorbant à 412 nm.

4. Appareillage

4.1 bain d'eau à 25°C
4.2 bain d'eau à 30°C
4.3 bain d'eau à 60°C
4.4 bain d'eau à 100°C
4.5 vase cylindrique de 100 mL
4.6 chronomètre
4.7 cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible
4.8 fiole jaugée d'1 L
4.9 fiole jaugée de 100 mL
4.10 pH mètre
4.11 seringue de précision 500-5000 µL
4.12 seringue de précision 100-1000 µL
4.13 seringue de précision 0-200 µL
4.14 seringue de précision 0-20 µL
4.15 spectrophotomètre
4.16 tubes en verre de 15 mL à vis étanches
4.17 portoir métallique pour tubes de 15 mL
4.18 agitateur de type vortex
4.19 agitateur magnétique

5. Produits

5.1 pectine d'agrume de degré d'estérification de 63-66%. (Pectines *ex-citrus* : Fluka, réf :76280) à titre d'exemple.

5.2 pectine estérase de peau d'orange (Fluka ; 20 U/mg, réf :76286) à titre d'exemple.
5.3 acétate de sodium (CH_3COONa pur à 99% - PM = 82g/mole)
5.4 acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM = 60 g/mole, densité = 1,058)
5.5 alcool oxydase de *Pichia Pastoris* (Sigma, 250 U ; 0.2 mL, réf : A2404) à titre d'exemple. Une unité d'alcool oxydase oxyde une µmole de méthanol en formaldéhyde par minute à pH 7,5 et 25°C.
5.6 acétate d'ammonium (CH_3COONH_4, pur à 99,5% - PM = 77,08g/mole)
5.7 pentane-2,4-dione ($C_5H_8O_2$ - PM = 100,12g/mole)
5.8 méthanol (CH_3OH, Analytical Reagent Grade - PM = 32g/mole)
5.9 dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4, pur à 99% - PM = 136,06 g/mole)
5.10 hydrogénophosphate de disodium ($Na_2HPO_4.2H_2O$ pur à 98,5% - PM = 178,05 g/mole)
5.11 eau distillée
5.12 préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1 Tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,5
Il est constitué de 2 solutions, A et B.
6.1.1 Solution A : introduire 4,10 g d'acétate de sodium (5.3) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).
6.1.2 Solution B : introduire 2,8 mL d'acide acétique (5.4) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).
6.1.3 Préparation du tampon acétate de sodium : mélanger 39,2% de solution A (6.1.1) + 60,8% de solution B (6.1.2). Vérifier que le pH est égal à 4,5 à l'aide d'un pH mètre (4.10).
Conserver à 4°C

6.2 Solution de pectine d'agrume à 0,5% (p/v)
Introduire 0,5g de pectine d'agrume (5.1) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.1) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9). La solution doit être préparée extemporanément.

6.3 Solution d'acide acétique 0,05 M
Introduire 0,2835 mL d'acide acétique (5.4) dans 100 mL d'eau distillée (5.11), dans une fiole jaugée de 100 mL (4.8).

6.4 Solution d'acétate d'ammonium 2 M
Dissoudre 15,4 g d'acétate d'ammonium (5.6) dans 100 mL d'acide acétique (6.3), dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9).

6.5 Pentane-2,4-dione 0,02 M
Introduire 40,8 µl de pentane-2,4-dione (5.7) dans 20 mL de solution d'acétate d'ammonium (6.4).
La solution doit être préparée extemporanément.

6.6 Tampon phosphate de sodium (0,25 M ; pH 7,5)
Il est constitué des solutions A et B.
6.6.1 Solution A : introduire 34,015 g de dihydrogénophosphate de potassium (5.9) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).
6.6.2 Solution B : introduire 44,5125 g de hydrogénophosphate de disodium (5.10) dans 1 litre d'eau distillée (5.11).
6.6.3 Préparation du tampon phosphate de sodium : mélanger 16,25 % de solution A (6.6.1) + 83,75% de solution B (6.6.2) pour obtenir un pH de 7,5. Vérifier le pH à l'aide d'un pH mètre (4.10).
Conserver à 4°C, une semaine maximum

6.7. Solution mère de méthanol à 40 µg/mL
Introduire 5 µL de méthanol (5.8) à l'aide d'une seringue de précision (4.14) dans 100 mL de tampon phosphate de sodium (6.6) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9).

6.8 Alcool oxydase à 1U/mL
Diluer l'alcool oxydase de *Pichia pastoris* (5.5) dans du tampon phosphate (6.6) afin d'obtenir une solution à 1U/mL. La solution doit être préparée extemporanément.

7. Préparation de la gamme étalon de méthanol

La gamme étalon est réalisée de 0 à 20 µg comme indiqué dans le tableau n°1. Elle est constituée de la solution mère de méthanol (6.7.)

Tableau 1 : gamme étalon de méthanol

Qté Méthanol (µg)	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**
Qté Méthanol (µmole)	0	0,1563	0,3125	0,4688	0,625
Vol solution mère (6.7.) (µl)	0	75	150	225	300
Vol tampon (6.6.) (µl)	600	525	450	375	300

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés au moment de l'utilisation.

8.1 Solution enzymatique à 1 g/l à préparer extemporanément
Placer 100 mg de préparation commerciale (5.12) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.9), compléter avec de l'eau distillée (5.11), agiter (4.19) afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2 Blanc dénaturé par chauffage à préparer extemporanément
Placer 10 mL de la solution enzymatique à 1 g/l (8.1) dans un tube à vis de 15 mL (4.16) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.4). Puis refroidir et centrifuger pendant 5 min à 6 500 g.

9. Mode opératoire

9.1 Cinétique enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.
Dans 5 tubes à vis de 15 mL (4.16) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.17) dans un bain d'eau à 30°C, introduire 100 µL de la solution enzymatique à 1 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision (4.13), 500 µL de solution de pectine d'agrume (6.2) préalablement portée à 30°C dans le bain d'eau, enclencher le chronomètre (4.6)
Après agitation (4.18), les tubes sont replacés dans le bain d'eau à 30°C (4.2)
durant 1 mn pour le tube n°1
durant 2 mn pour le tube n°2
durant 5 mn pour le tube n°3
durant 10 mn pour le tube n°4
durant 15 mn pour le tube n°5
La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 30°C, dans le bain d'eau à 100°C (4.4) durant 10 mn.

Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.
Note : le point de cinétique à 10 min permet d'évaluer l'activité enzymatique recherchée.

9.2 Dosage du méthanol libéré
Dans un tube à vis de 15 mL (4.16) ajouter 1 mL de solution d'alcool oxydase (6.8) au milieu réactionnel (9.1), à l'aide de la seringue de précision (4.12), enclencher le chronomètre (4.6). Après agitation (4.18), le tube est placé dans le bain d'eau à 25°C (4.1) pendant 15 min.
Ajouter ensuite 2 mL de pentane-2,4-dione à 0,02 M (6.5) à l'aide de la seringue de précision (4.11) , enclencher le chronomètre (4.6).
Après agitation (4.18), le tube est placé dans le bain d'eau à 60°C (4.3) pendant 15 min.
Le tube est ensuite refroidi sous courant d'eau froide.
Placer le surnageant résultant dans une cuve (4.7).
Réaliser le zéro du spectrophotomètre avec de l'eau distillée.
Mesurer aussitôt l'absorbance à 412 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.15).

9.3 Blancs
Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 1 g/l (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). Pour chaque point de cinétique, la réaction enzymatique de chaque blanc est réalisée en même temps que celle de la solution enzymatique.

9.4 Gamme étalon
Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon de méthanol de 0 à 20 µg (7).

10. Calculs

10.1 Réalisation d'une cinétique
De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique :
enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1)

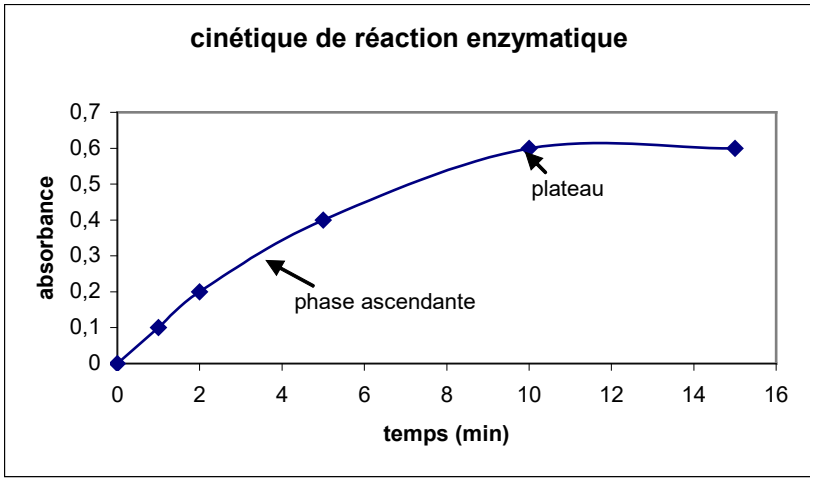


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 12 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min, T=15 min.

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2 Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme étalon de méthanol (de 0 à 0,625 µmole) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente de la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3 Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 mn pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q de méthanol libéré (en
µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

La formule pour calculer l'activité enzymatique en U/g de préparation est la suivante :

$$\text{Activité en U/g} = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

Avec Q : quantité de méthanol libéré en µmoles pendant un temps T (min)
V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,1 mL
C : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 1 g/l

Ensuite, il est possible d'exprimer l'activité enzymatique en nanokatal. Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde dans les conditions définies par les protocoles de dosages et donc :

$$\text{Activité en nkat/g} = (\text{ activité en U /g }) \times (1000/60)$$

11. Caractéristiques de la méthode

r	0,14
R	0,112
Sr	0,05
SR	0,04

La répétabilité intralaboratoires de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la pectine méthyl estérase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,05 avec un pourcentage d'erreur de 5,46. Le % d'erreur correspondant à :

$$\frac{\text{(moyenne des écarts-types des valeurs x 100)}}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité intralaboratoires ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non ». Cette analyse de variance donne un écart type de reproductibilité de 0,04.
- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.

Si la puissance est faible ($\cong$ 20%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.
Si la puissance est élevée ($\cong$ 80%), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avions les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2:

Dosages	**Hypothèses de l'analyse de variance**	**Probabilité**	**Puissance de l'essai (α = 5%)**	**Test Newman-Keuls (*)**	**Test Bonferroni (**)**
PME	Respectées	0,00001	99%	Significatif	Significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un

même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi
** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, (t (t-1))/2 comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%.

12. Références bibliographiques

KLAVONS J.A., BENNET R.D., Determination of methanol using alcohol oxydase and its application to methyl ester content of pectins. J. Agr. Food. Chem, 1986. Vol 34, p 597-599.

Activités enzymatiques et leurs mesures – OIV Document, FV 1226, 2005

Détermination de l'activité pectine méthyl estérase par titrage acide-base

1. Principe

L'activité de déméthylation de la pectine méthyl estérase a pour conséquence l'apparition de groupes carboxyliques libres au niveau des acides galacturoniques constituant les chaînes. Pour déterminer l'activité pectine méthyl estérase, les groupes carboxyliques peuvent être titrés au cours de l'hydrolyse enzymatique avec une solution d'hydroxyde de sodium à température constante et valeur pH constante.

2. Équipement et matériel

- équipement de titrage (burette)
- plaque chauffante à régulation thermique et agitateur magnétique / barreau magnétique
- pH-mètre
- coupelle en verre, remplie d'eau
- chronomètre
- fioles jaugées (de différents volumes)
- béchers (de préférence 50 mL)
- pipettes de précision (de différents volumes)
- agitateur vortex

3. Produits chimiques et réactifs

- Pectine hautement estérifiée ; qualité p.a. (Sigma P9135-100G) ; CAS 9000-69-5
- Solution NaOH 0,01 M (Titrisol) qualité p.a. ; CAS 1310-73-2
- Pastilles de NaOH qualité p.a. ; CAS:1310-73-2

4. Préparation des solutions

4.1. NaOH 1 M

Dissoudre 4 g de NaOH dans 100 mL de H_2O

4.2. Solution substrat

Une solution substrat à 1 % de pectine dans H_2O est préparée par dissolution très lente de 2,0 g de pectine dans 150 mL de H_2O. Par la suite on ajuste la valeur du pH à pH 4,0 à 40 °C avec du NaOH 1 M. Il faut compléter la solution

jusqu'à 200 mL précisément. Juste avant la mesure il faut à nouveau contrôler la valeur du pH et la corriger à pH 4,0 si nécessaire

4.3. Solution enzymatique

La solution enzymatique est composée à partir d'une préparation enzymatique disponible dans le commerce d'environ 30 à 50 mg/L, qui est diluée dans l'eau froide. Cette solution doit être préparée juste avant utilisation.

4.4. NaOH 0,01M

Cette solution prête à l'emploi doit être diluée conformément aux instructions du producteur.

5. Détermination de l'activité enzymatique

Verser 20 mL de solution substrat dans un bécher (agitateur magnétique en place) déposé sur la plaque chauffante à régulation thermique dans une coupelle en verre, laquelle est remplie d'eau chauffée à 40 °C. Introduire l'électrode de mesure du pH dans la solution substrat. Il est nécessaire de contrôler, et éventuellement d'ajuster de nouveau la valeur du pH à 40°C avant de commencer l'analyse. Ajouter ensuite 0,1 mL de la solution enzymatique. Démarrer le chronomètre à ce moment précis. La valeur du pH doit être mesurée pendant l'analyse et l'échantillon doit être titré jusqu'au pH 4,0 avec NaOH 0,01 M pendant 10 minutes à 40 °C. Arrêter l'analyse après 10 minutes et relever la consommation de NaOH 0,01 M.

La consommation de NaOH 0,01 M devrait être de l'ordre de 3,5 mL à 8,5 mL. Dans le cas contraire, il est recommandé de diluer ou de concentrer la solution enzymatique.

6. Calcul de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité (U/mg)} = n / (t*v*c)$$
$$\text{Activité (nkat/g)} = (\text{Activité (U/g)} * 1000/60) * 1000$$

n = consommation de NaOH 0,01 M en µmol
t = temps en minutes (dans ce cas 10 minutes)
v = quantité de solution enzymatique utilisée en mL (= 0,1 mL)
c = concentration de la solution enzymatique en g/L

Validation du titrage acide-base pour déterminer l'activité pectine méthyl estérase

La valeur moyenne de l'écart type a été déterminée pour 8 enzymes différentes.
Chaque enzyme a été analysée 6 fois.
Valeur moyenne de l'écart type des différentes enzymes : 3,91%

	Enzyme 1 40 mg/mL	**Enzyme 2 40 mg/mL**	**Enzyme 3 40 mg/mL**	**Enzyme 4 40 mg/mL**	**Enzyme 5 40 mg/mL**	**Enzyme 6 40 mg/mL**	**Enzyme 7 30 mg/mL**	**Enzyme 8 50 mg/mL**	**Enzyme 8 30 mg/mL**
Valeur moyenne (nkat/g)	14527,7	19291,7	12756,8	9534,7	9444,5	18577,8	31591,7	10888,9	9446,5
Écart type (nkat/g)	282,3	449,5	366,4	227,4	272,3	145,6	540,9	944,4	1096,1
Écart type %	**1,9**	**2,3**	**2,9**	**2,4**	**2,9**	**0,8**	**1,7**	**8,7**	**11,6**
$s^2(r)$	66410	168402	111863	43097	61786	17654	243773	743210	1001244
s (r)	257,7	410,4	334,5	207,6	248,6	132,9	493,7	862,1	1000,6
Répétabilité r (nkat/g)	729,3	1161,3	946,5	581,5	703,4	376,0	1397,3	2439,7	2831,8

Enzyme	**Concentration**	**U/mg**	**nkat/g**
Enzyme 1	40 mg/mL	0,89	14833
Enzyme 1	40 mg/mL	0,89	14750
Enzyme 1	40 mg/mL	0,88	14667
Enzyme 1	40 mg/mL	0,85	14083
Enzyme 1	40 mg/mL	0,87	14500
Enzyme 1	40 mg/mL	0,86	14333

Enzyme 1 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	14527,7		93228,4
écart type (nkat/g)	282,30		49432,1
écart type %	1,9		19413,8
variance	3,8		197728,4
$s^2(r)$	66410,6		765,4
s(r)	257,7		37895,1
r (nkat/g) répétabilité	729,3	total	398463,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 2	40 mg/mL	1,185	19750
Enzyme 2	40 mg/mL	1,155	19250
Enzyme 2	40 mg/mL	1,130	18833
Enzyme 2	40 mg/mL	1,125	18750
Enzyme 2	40 mg/mL	1,190	19833
Enzyme 2	40 mg/mL	1,160	19333

Enzyme 2 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	19291,7		210069,4
écart type (nkat/g)	449,54		1736,1
écart type %	2,3		210069,4
$s^2(r)$	168402,8		293402,8
s(r)	410,4		293402,8
r (nkat/g) répétabilité	1161,3		1736,1
		total	1010416,7

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 3	40 mg/mL	0,78	13042
Enzyme 3	40 mg/mL	0,79	13208
Enzyme 3	40 mg/mL	0,76	12708
Enzyme 3	40 mg/mL	0,76	12583
Enzyme 3	40 mg/mL	0,77	12833
Enzyme 3	40 mg/mL	0,73	12167

Enzyme 3 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	12756,8		81320,0
écart type (nkat/g)	366,38		203551,4
écart type %	2,9		2384,7
$s^2(r)$	111863,1		30218,0
s(r)	334,5		5801,4
r (nkat/g) répétabilité	946,5		347903,4
		total	671178,8

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 4	40 mg/mL	0,57	9500
Enzyme 4	40 mg/mL	0,59	9875
Enzyme 4	40 mg/mL	0,56	9333
Enzyme 4	40 mg/mL	0,56	9250
Enzyme 4	40 mg/mL	0,58	9583
Enzyme 4	40 mg/mL	0,58	9667

Enzyme 4 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	9534,67		1201,8
écart type (nkat/g)	227,41		115826,8
écart type %	2,4		40669,4
$s^2(r)$	43096,9		81035,1
s(r)	207,6		2336,1
r (nkat/g) répétabilité	587,5		17512,1
		total	258581,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 5	40 mg/mL	0,55	9167
Enzyme 5	40 mg/mL	0,59	9792
Enzyme 5	40 mg/mL	0,55	9083
Enzyme 5	40 mg/mL	0,57	9458
Enzyme 5	40 mg/mL	0,57	9542
Enzyme 5	40 mg/mL	0,58	9625

Enzyme 5 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	9444,5		77006,3
écart type (nkat/g)	272,29		120756,3
écart type %	2,9		130682,3
$s^2(r)$	61785,6		182,3
s(r)	248,6		9506,3
r (nkat/g) répétabilité	703,4		32580,3
		total	370713,5

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 6	40 mg/mL	1,105	18417
Enzyme 6	40 mg/mL	1,118	18633
Enzyme 6	40 mg/mL	1,125	18750
Enzyme 6	40 mg/mL	1,105	18417
Enzyme 6	40 mg/mL	1,112	18533
Enzyme 6	40 mg/mL	1,123	18717

Enzyme 6 40 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	18577,8		25956,8
écart type (nkat/g)	145,55		3086,4
écart type %	0,8		29660,5
$s^2(r)$	17654,3		25956,8
s(r)	132,9		1975,3
r (nkat/g) répétabilité	376,0		19290,1
		total	105925,9

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 7	30 mg/mL	1,920	32000
Enzyme 7	30 mg/mL	1,947	32450
Enzyme 7	30 mg/mL	1,873	31217
Enzyme 7	30 mg/mL	1,860	31000
Enzyme 7	30 mg/mL	1,893	31550
Enzyme 7	30 mg/mL	1,880	31333

Enzyme 7 30 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	31591,7		166736,1
écart type (nkat/g)	540,86		736736,1
écart type %	1,7		140625,0
$s^2(r)$	243773,1		350069,4
s(r)	493,7		1736,1
r (nkat/g) répétabilité	1397,3		66736,1
		total	1462638,9

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 8	50 mg/mL	0,578	9633
Enzyme 8	50 mg/mL	0,682	11367
Enzyme 8	50 mg/mL	0,706	11767
Enzyme 8	50 mg/mL	0,712	11867
Enzyme 8	50 mg/mL	0,596	9933
Enzyme 8	50 mg/mL	0,646	10767

Enzyme 8 50 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	10888,9		1576419,8
écart type (nkat/g)	944,38		228271,6
écart type %	8,7		770493,8
$s^2(r)$	743209,9		956049,4
s(r)	862,1		913086,4
r (nkat/g) répétabilité	2439,7		14938,3
		total	4459259,3

Enzyme	Concentration	U/mg	nkat/g
Enzyme 8	30 mg/mL	0,69	11444
Enzyme 8	30 mg/mL	0,067	8667
Enzyme 8	30 mg/mL	0,063	8889
Enzyme 8	30 mg/mL	0,065	8429
Enzyme 8	30 mg/mL	0,07	9625
Enzyme 8	30 mg/mL	0,067	9625

Enzyme 8 30 mg/mL			(X-MW)^2
valeur moyenne (nkat/g)	9446,5		3990006,3
écart type (nkat/g)	1096,13		607620,3
écart type %	11,6		310806,3
$s^2(r)$	1001243,9		1035306,3
s(r)	1000,6		31862,3
r (nkat/g) répétabilité	2831,8		31862,3
		total	6007463,5

valeur moyenne des écarts types en %	**3,91**

UREASE
E.C. 3.5.1.5.
CAS N°: 9002-13-5
(Oeno 5/2005)

SPECIFICATIONS GENERALES

Les spécifications doivent être conforme aux spécifications générales pour les préparations enzymatiques qui figurent dans le Codex œnologique international

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La finalité de l'enzyme est de dégrader l'urée en ammoniaque et dioxyde de carbone. L'uréase est produite à partir de *Lactobacillus fermentum* . Elle appartient au groupe des uréases appelées collectivement "uréases acides". Elle est activée à des pH bas.

L. fermentum est cultivé en milieu synthétique. Après fermentation, la culture est filtrée, lavée à l'eau et les cellules sont tuées dans de l'alcool à 50 % vol. La suspension est séchée par lyophilisation ou par pulvérisation.

La préparation consiste donc en une poudre constituée de cellules mortes entières contenant l'enzyme.

L'uréase ne contient ni substances, ni micro-organismes ni activités enzymatiques collatérales qui peuvent :

- être nuisibles à la santé,
- être nuisibles à la qualité des produits traités,
- conduire à la formation de produits indésirables,
- occasionner ou faciliter une fraude.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, ainsi que les conditions de sécurité, de conservation et la date limite d'utilisation.

3. ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'activité enzymatique spécifique déclarée est de 3,5 U/mg, à savoir une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'hydroxyde d'ammonium à partir d'une solution d'urée à la dose de 5 g/l, par minute, à pH 4 en milieu tampon citrate 0,1 M , à la température de 37 ^{0}C.

Cette activité est la seule mise en évidence.

4. CARACTERES

L'uréase se présente sous forme de poudre cristalline, blanche, inodore, d'une saveur douceâtre.

5. SUPPORTS, DILUANTS, AGENTS CONSERVATEURS

La seule substance additionnée pour le conditionnement est de la dextrine.

6. ESSAIS

6.1 Cendres sulfuriques

Déterminer les cendres sulfuriques selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

Le taux de cendres sulfuriques de l'uréase ne doit pas être supérieur à 8 p. 100.

6.2 Solution pour essais :

Dissoudre 5 g d'uréase dans 100 ml d'eau.

6.3 Métaux lourds

A 10 ml de solution pour essais (6.2), ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R), 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Aucun précipité ne doit se produire. Si une coloration brune apparaît, elle doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué au chapitre II du Codex Œnologique International.

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

6.4 Arsenic

A partir de la solution pour essais (6.2), doser l'arsenic selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 2 mg/kg.

6.5 Plomb

A partir de la solution pour essais (6.2), doser le plomb selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

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

6.6 Mercure

A partir de la solution pour essais (6.2), doser le mercure selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

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

6.7 Cadmium

A partir de la solution pour essais (6.2), doser le cadmium selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international
La teneur en cadmium doit être inférieure à 0,5 mg/kg.

7. CONTAMINANTS BIOLOGIQUES

Procéder au dénombrement selon les méthodes décrites au chapitre II du Codex Œnologique International

7.1 Bactéries Totales	inférieures à 5 x 10^4 UFC/g
7.2 Coliformes	absence vérifiée
7.3 *Escherichia coli*	absence vérifiée sur un échantillon de 25 g
7.4 *St. aureus*	absence vérifiée sur un échantillon de 1 g
7.5 Salmonelles	absence vérifiée sur un échantillon de 25 g.

Aucune activité mutagène bactérienne ne doit être décelable

Il est également admis qu'aucune souche de Lactobacillus ne produit des antibiotiques.

8. APPLICATION AU VIN

L'uréase doit être incorporée et mélangée soigneusement dans les vins destinés à un vieillissement supérieur à 1 an s'ils contiennent plus de 3 mg/l d'urée. Les doses d'utilisation seront de 25 mg/l à 75 mg/l, en fonction des tests réalisés au préalable. L'action s'effectue en moins de 4 semaines à température supérieure à 15 °C et lorsque les ions fluorures sont en quantité inférieure à 1 mg/l.

- Après diminution notable de l'urée, par exemple à moins de 1 mg/l, toute activité enzymatique est éliminée par filtration du vin (diamètre des pores inférieur à 1 µm).

9. CONDITIONS DE CONSERVATION

L'uréase se conserve plusieurs mois à basse température (+ 5 °C). La perte d'activité est d'environ 50 % par an.

COLLE DE POISSON
Ichtyocolle
(Oeno 24/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La colle de poisson est préparée avec la vessie natatoire, les ouïes, les oreillons de certains poissons, notamment des esturgeons.

Elle se présente en feuilles transparentes incolores ou légèrement jaunâtres, ou le plus souvent, en lanières ayant l'apparence du parchemin sec ou sous forme vermiculée ou en poudre.

La colle de poisson gonfle dans l'eau froide en devenant opaque ; elle se dissout dans l'eau chaude acidulée par l'acide tartrique en laissant au plus 3 p. 100 de résidu constitué par des membranes. Avec 30 à 50 parties d'eau chaude, elle donne, après refroidissement, une gelée incolore et translucide.

La colle de poisson est aussi présentée souvent, après hydrolyse partielle, sous forme de solutions colloïdales prêtes à l'emploi, stabilisées par du SO_2. Dans ce cas, elle doit être conservée au frais en récipient fermé.

La colle de poisson est utilisée pour la clarification des vins blancs et rosés.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de sécurité et de conservation. La date limite d'utilisation et la teneur en SO_2 seront mentionnées sur l'étiquette.

3. ESSAIS

3.1 La solution dans l'eau chaude doit être sans odeur ni saveur désagréable, de réaction neutre ou légèrement alcaline. Elle précipite avec le tanin.

Son pH est compris entre 3,5 et 4 si de l'acide tartrique a été utilisé pour faciliter sa dissolution.

3.2 La colle de poisson traitée par une solution d'hydroxyde de potassium (R) doit rester transparente et donner après quelques heures, un liquide incolore qui, avec le temps, laisse apparaître un léger précipité floconneux. Dans les mêmes conditions, la gélatine devient opaque, se solubilise difficilement et donne un précipité blanc abondant.

3.3 Recherche des substances albuminoïdes. La solution aqueuse ne doit pas précipiter par addition d'une solution de sulfate de fer(III) (R).

3.4 Perte à la dessiccation

3.4.1 *Colle de poisson présentées à l'état solide*

Dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre avec couvercle, placer 2g de colle de poisson. Dessécher à l'étuve à 100-105°C durant 6 heures. Laisser refroidir en capsule ouverte dans un dessiccateur. Peser. Soit **p** la quantité de résidu sec ; la perte de poids ne doit pas dépasser 18 p. 100

3.4.2 *Colle de poisson présentée à l'état liquide*

Dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre, placer environ 10 g de solution colloïdale de colle de poisson, peser exactement cette quantité en capsule ouverte, dessécher sur bain d'eau à 100°C durant 4 heures et terminer la dessiccation à l'étuve à 100-105°C durant 3 heures. Laisser refroidir en capsule ouverte dans dessiccateur. Peser la quantité de résidu sec. Soit p cette quantité rapportée à 100 g de solution colloïdale, le résidu sec doit atteindre 1 p.100 au minimum

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

3.5 Cendres

Incinérer le résidu sec de l'essai 3.4 en le chauffant progressivement à 600°C au four à moufle après avoir saupoudré la colle de poisson de 0,2 à 0,3 g de paraffine sans cendres pour éviter le débordement de la masse.

Le taux de cendres ne doit être supérieur à 2 p. 100.

3.6 Préparation de la solution pour essais

Après la pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau. Chauffer pour activer la dissolution et ajouter de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume égal à 25 fois le poids de la colle de poisson sèche. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0, 04 g de colle de poisson sèche.

3.7 Azote total

Se reporter à la méthode décrite en annexe

La teneur en Azote total doit être supérieure à 14 p. 100.

3.8 Fer

10 ml de la solution préparée pour essais (3;6) sont additionnés de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), d'une goutte de permanganate de Potassium à 1 p.100 (R) et de 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p.100 (R).

Si une coloration rouge apparaît elle doit être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 4,2 ml de solution de fer(III) à 0,010 g par litre, 5,8 ml d'eau et les mêmes volumes d'acide chlorhydrique concentré (R) et de thiocyanate de potassium à 5 p.100

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

Il est également possible de procéder au dosage du fer par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

3.9 Arsenic

A partir de la solution préparée pour essais (3.6), doser l'arsenic selon la méthode figurant en annexe. Teneur inférieure à 3 mg/kg.

3.10 Plomb

A partir de la solution préparée pour essais (3.6), doser le plomb selon la méthode figurant au Recueil. (Teneur inférieure à 5 mg/kg).

3.11 Mercure

A partir de la solution préparée pour essais (3.6), doser le mercure selon la méthode figurant en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg)

4. CONSERVATION

La colle de poisson doit être conservée dans des flacons hermétiques, une date limite d'utilisation sera précisée.

Les solutions colloïdales doivent être stockées à des températures inférieure à 10°C afin d'éviter une hydrolyse rapide du produit durant sa conservation.

PLAQUES DE FILTRATION EN PROFONDEUR (Oeno 629-2021)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION :

Les plaques de filtration en profondeur, qui appartiennent à la famille des matériaux filtrants poreux, sont constituées de matériaux organiques et/ou inorganiques et sont généralement utilisées pour la clarification et/ou la stabilisation microbiologique de liquides ; leur géométrie est spécifique aux systèmes de filtration définis par les fabricants.

2. PRINCIPE

La filtration assurée par les plaques de filtration en profondeur est un procédé de séparation physique, appliqué à des particules allant de 0,1 à 40 µm et permettant la rétention de bactéries, levures, autres microorganismes et particules. La rétention des particules se base sur un processus d'interception et d'adsorption ayant lieu au sein des plaques (piège en profondeur), et dans une moindre mesure de tamisage sur la surface externe, lors du passage du fluide à travers celles-ci sous l'action d'un gradient de pression. Les plaques de filtration en profondeur sont caractérisées par leur perméabilité et leur taux de rétention, permettant ainsi différents types de filtrations : grossière, clarifiante, ou stérilisante.

Le traitement des moûts et des vins par filtration est décrit dans le *Code international des pratiques œnologiques* de l'OIV.

La filtration à l'aide de plaques de filtration en profondeur est conduite avec un dispositif de filtration et/ou un carter lenticulaire à modules et une pompe d'alimentation. Généralement, le processus de filtration est terminé lorsqu'une pression différentielle de 300 kPa (3 bars) est atteinte. Pour des raisons de performance de la filtration, il convient de ne pas excéder un différentiel de pression de 150 kPa (1,5 bars) au cours des applications de séparation des microorganismes, qui doivent être réalisées à flux constant.

3. COMPOSITION

Les plaques de filtration en profondeur sont fabriquées à partir de matériaux bruts spécifiquement sélectionnés à cet effet, tels que les fibres de cellulose finement fibrillées, blanchies et purifiées obtenues à partir de bois de conifères et de feuillus, ainsi que différentes quantités d'adjuvants de filtration inorganiques et organiques, tels que terre de diatomées, perlite, zéolithe, silicates, PVPP, pulpe de bois synthétique, charbon actif et/ou autres

composés considérés par l'OIV. Les polymères de polyamidoamines sont utilisés en tant qu'agent de résistance à l'état humide afin d'améliorer les propriétés en traction, aussi bien à l'état humide que sec, en assurant une réticulation des fibres de cellulose au travers de liaisons covalentes qui ne se rompent pas après humidification. Les fibres sèches contenues dans le produit fini doivent présenter une teneur en agents de résistance à l'état humide non supérieure à 4 %. Les principaux composants et leurs monographies figurent dans le *Codex œnologique international* de l'OIV. L'utilisation d'agents de résistance à l'état humide est approuvée pour un usage au sein de papiers de filtration en milieu aqueux chaud ou froid[7].

4. ÉTIQUETAGE

Les principales caractéristiques du produit doivent être indiquées sur l'étiquette, notamment le degré de filtration, la taille et le numéro de lot.

5. FABRICATION

Une pâte formée à partir des composés précédemment cités est drainée sur une bande de tamisage à vide, puis séchée dans un four.

La mise en œuvre d'une série de procédures – raffinage/mouture/fibrillation – pratiquées sur la cellulose et l'utilisation d'adjuvants de filtration inorganiques de diverses compositions permet d'obtenir tout un éventail de perméabilités et de degrés de rétention (de 0,1 à 40 µm).

Les caractéristiques finales des plaques de filtration en profondeur (épaisseurs, porosité, taille des pores, débit, réduction des microorganismes et adsorption) dépendent de nombreux paramètres (choix de fibres de cellulose issues de bois de conifères et/ou de feuillus, quantité et type du matériau inorganique, teneur en eau, température, etc.).

Les plaques de filtration en profondeur peuvent être produites en différentes géométries, avec découpe à l'emporte-pièce ou à jet d'eau, et utilisées au sein de filtres à plaques, de modules lenticulaires de filtration, de capsules ou autres.

[7] Selon les normes correspondantes du BfR (Allemagne), de la FDA (États-Unis), la norme GB 9685 et les autres codes relatifs aux denrées alimentaires, produits de consommation courante et aliments pour animaux.

6. AFFRANCHISSEMENT ET STÉRILISATION DES PLAQUES DE FILTRATION EN PROFONDEUR

Les plaques de filtration en profondeur doivent être affranchies à l'eau avant de procéder à la première filtration, selon les instructions du fabricant. Après l'opération, la solution de rinçage doit être éliminée de la façon prescrite par les réglementations locales en vigueur. Les plaques de filtration en profondeur peuvent être stérilisées à l'eau chaude (85 °C) ou à la vapeur en ligne (125 °C à 134 °C max.). Dans les deux cas, le rinçage doit durer au moins 20 minutes.

7. RÉGÉNÉRATION / RÉTROLAVAGE

Lorsque la pression différentielle maximale est atteinte, il est possible de procéder à une régénération des plaques filtrantes. En fonction de la nature des particules colmatantes, il est possible de prolonger ainsi la durée de vie du filtre.

Pour régénérer les plaques filtrantes, les rincer à l'eau froide (15-20 °C) dans le sens du flux de filtration pendant environ 5 minutes, puis les rincer à l'eau chaude (60-80 °C) à contre-courant pendant environ 10 minutes. Il est recommandé de ne pas réaliser plus de cinq cycles de régénération par plaque filtrante. Il est également recommandé, pour des raisons de sécurité bactériologique, de remplacer les plaques filtrantes au plus tard quatre semaines après leur première utilisation.

8. ÉLIMINATION

Pour la mise au rebut des plaques de filtration en profondeur, il convient de respecter les consignes locales de tri des différentes catégories de déchets. En principe, les plaques filtrantes usagées sont biodégradables[8]. En respectant les réglementations locales en vigueur, elles peuvent être éliminées comme déchets domestiques par mise en décharge ou destruction thermique. Ces dispositions sont valables à condition que les plaques de filtration en profondeur ne soient entrées en contact avec aucune substance toxique au cours du processus de filtration. Ces indications sont également applicables aux plaques de filtration en profondeur utilisées au sein de modules lenticulaires de filtration ou d'autres systèmes.

9. ESSAIS

[8] Selon la norme EN 13432:2000 (Emballages valorisables par compostage et biodégradation).

Tous les équipements (plaques de filtration en profondeur, modules lenticulaires de filtration ou autres composants et produits du système de filtration) en contact avec des denrées alimentaires doivent être en conformité avec les limites suivantes.
Aucune altération appréciable des caractéristiques sensorielles (organoleptiques) des moûts et des vins ne devrait apparaître si les plaques de filtration en profondeur sont utilisées et manipulées conformément aux recommandations du fabricant.

Les limites sont déterminées en fonction des valeurs observées à partir de plaques de filtration en profondeur manufacturées selon les bonnes pratiques de fabrication.

9.1 Teneur en matières sèches dans un extrait aqueux

Les produits peuvent être utilisés en milieu aqueux chaud ou froid en tant que papiers de filtration et couches filtrantes pour denrées alimentaires.

Déterminer la teneur en matière sèche, après prérinçage de la plaque de filtration en profondeur avec un volume de 50 L/m^2 avant extraction, selon les méthodes suivantes :

- la quantité totale de substances extractibles (extrait aqueux à chaud)[9] [10] doit être inférieure à 10 mg/g,
- la quantité totale de substances extractibles (extrait aqueux à froid)[11] Error: Reference source not found doit être inférieure à 5 mg/g,
- la quantité totale de substances organiques extractiblesError: Reference source not found Error: Reference source not found doit être inférieure à 2 mg/g.

9.2 Teneur en chloropropanols

Les teneurs de 1,3-dichloro-propan-2-ol (DCP) et de 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD) sont déterminées après prérinçage de la plaque de filtration en profondeur à l'aide d'un volume d'eau de 50 L/m^2, dans l'extrait aqueux résultant à froid/à chaudError: Reference source not found Error: Reference source not found.
Les dosages du DCP et du MCPD[12] sont effectués après :

- séparation des analytes à partir de l'extrait aqueux réalisée sur une

[9] Selon la norme EN 647:1993 (Préparation d'un *extrait* aqueux à *chaud*).
[10] Selon la norme EN 920:2000 (Détermination de la teneur en matières sèches dans un *extrait aqueux*).
[11] Selon la norme EN 645:1993 (Préparation d'un *extrait* aqueux à froid).
[12] Effectués conformément au paragraphe 35 de la LMBG, méthode 80.56-2 (LMBG – loi allemande sur les denrées alimentaires et les produits de consommation courante).

colonne d'extraction en phase solide. Le DCP et le MCPD sont dérivés à l'aide d'heptafluorobutyrylimidazole (HFBI), le dosage étant réalisé par chromatographie CG-DCE.

9.2.1 Teneur en 1,3-dichloro-propan-2-ol (DCP)

- Procéder au dosage conformément au point 9.2,
- La teneur en 1,3-dichloro-propan-2-ol (DCP) doit être inférieure à 2 µg/L dans un extrait aqueux à froid/à chaud.

9.2.2 Teneur en 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD)

- Procéder au dosage conformément au 9.2,
- la teneur en 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD) doit être inférieure à 12 µg/L dans un extrait aqueux à froid/à chaud.

9.3 Teneur en métaux solubles et métaux lourds

La teneur en métaux solubles, de même que celle des métaux lourds, est toujours déterminée dans l'extrait résultant d'un prérinçage de la plaque de filtration en profondeur, en utilisant un volume de 50 L/m^2. Pour l'extraction, on emploie de l'acide acétique à 5 % (p.a.).

Procédure d'extraction :

- placer le support du filtre horizontalement ; pour une meilleure ventilation, orienter le filtre du bas vers le haut,
- débit volumétrique : V = (500 ± 50) L m^{-2} h^{-1},
- volume de départ : 25 L m^{-2},
- pomper le volume de départ en continu en circuit fermé, jusqu'à ce qu'un volume de 100 L m^{-2} soit passé à travers la plaque de filtration en profondeur (puisque V = 500 L m^{-2} h^{-1}, la durée de filtration est d'exactement 12 minutes),
- en cas d'égouttement, récupérer les gouttes et les rajouter au volume général après la filtration,
- une fois le temps de filtration écoulé, arrêter l'élution ; ne pas procéder à la vidange du filtre par la pression.

9.3.1 Métaux lourds

Le dosage des métaux lourds (mg de métal par kg de plaque de filtration en profondeur) est réalisé dans l'extrait à l'aide de la spectrométrie d'absorption atomique (flamme/four graphite) :

- procéder à l'extraction conformément au point 9.3,

- la teneur en métaux lourds extractibles doit être inférieure à 50 ppm[13].

9.3.2 Fer

- Procéder à l'extraction du fer conformément au point 9.3,

déterminer la concentration en cations correspondante dans le filtrat,

- La teneur en fer est déterminée selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
- la teneur en fer doit être inférieure à 300 mg/kg.

9.3.3 Plomb

- Procéder à l'extraction du plomb conformément au point 9.3,

déterminer la concentration en cations correspondante dans le filtrat

- La teneur en plomb est déterminée selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
- la teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

9.3.4 Mercure

- Procéder à l'extraction du mercure conformément au point 9.3,

déterminer la concentration en cations correspondante dans le filtrat

- La teneur en mercure est déterminée selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
- la teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

9.3.5 Arsenic

- Procéder à l'extraction de l'arsenic conformément au point 9.3,

déterminer la concentration en cations correspondante dans le filtrat

- La teneur en arsenic est déterminée selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
- la teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

9.3.6 Cadmium

- Procéder à l'extraction du cadmium conformément au point 9.3,
- déterminer la concentration en cations correspondante dans le filtrat
- La teneur en cadmium est déterminée selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
- la teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

[13] Selon la recommandation XXXVI/1 de l'Institut fédéral allemand pour l'évaluation des risques (BfR).

10. CONTRAINTES PARTICULIÈRES

Les plaques de filtration en profondeur, les modules lenticulaires de filtration et tous les autres composants et produits doivent répondre aux exigences réglementaires des matériaux en contact avec les denrées alimentaire.

11. CONSERVATION

Les plaques de filtration en profondeur sont composées de matériaux très adsorbants. Le produit doit être manipulé avec soin durant le transport et le stockage. Stocker les plaques de filtration en profondeur, dans leur emballage original, dans un lieu sec, exempt d'odeurs et bien ventilé. Ne pas exposer les plaques de filtration en profondeur à la lumière directe du soleil. Stockées de manière appropriée, les plaques filtrantes ne se dégradent pas. Selon les fabricants, il est recommandé d'utiliser les plaques filtrantes dans les 5 ans suivant leur achat.

GELATINE

Proteinum ossii
Gelatina
(Oeno 13/2003)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La gélatine est le produit de l'hydrolyse partielle du collagène contenu dans les peaux, le tissu conjonctival et les os des animaux. Elle se présente en plaques, feuilles flexibles, brisures, grains ou poudre incolore ou légèrement jaune brun.

Certaines gélatines sont intentionnellement hydrolysées plus profondément que la gélatine alimentaire habituelle, pour pouvoir être présentées, soit en solutions colloïdales prêtes à l'emploi, soit sous forme de poudre atomisée soluble à froid. Ces produits ne présentent donc pas le caractère de donner des gels avec l'eau.

La structure et le point isoélectrique des protéines des gélatines de peaux de bovins sont différents de celles issues des os et des couennes de porcs.

Compte tenu des données scientifiques disponibles, des normes et des directives internationales, la gélatine doit provenir de sources animales conformes aux recommandations de l'Office international des Epizooties (OIE).

Agent de collage et de clarification des vins, la gélatine réagit avec les tanins des vins ou ajoutés et certains cations en fonction de leur origine, du procédé d'extraction et de leur degré final d'hydrolyse au moment de leur utilisation dans le vin.

Pour une même qualité de gélatine, la qualité de l'hydrolyse et les différents stades d'hydrolyse donneront des produits de comportements très différents au niveau du collage.

Il n'existe pas de paramètre unique pour caractériser les gélatines en raison de leur diversité.

2. ETIQUETAGE

L'origine de la gélatine alimentaire de base doit être indiquée ainsi que les conditions optimales de conservation, la date limite d'utilisation et la concentration en SO_2.

3. SOLUBILITE

La gélatine alimentaire de base gonfle dans l'eau froide.

Elle se dissout dans l'eau chaude (80 à 90 °C) et la solution se prend en gelée par refroidissement.

4. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

4.1 Examen gustatif

La solution dans l'eau chaude doit être sans odeur ou goût désagréable.

4.2 pH

Déterminer le pH sur la solution à 1 p. 100 maintenue à 40 °C;

Le pH des solutions colloîdales est compris entre 3 et 4

le pH des solutions préparées à partir des produits en poudre ou en grains est compris entre 5 et 7.

4.3 Perte à la dessiccation

4.3.1 Gélatines présentées à l'état solide :

Dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre avec couvercle, placer 2 g de gélatine. Dessécher à l'étuve à 100-105 °C durant 6 heures. Laisser refroidir en capsule couverte et en dessiccateur. Peser. Soit **p** g la quantité de résidu sec ; la perte de poids ne doit pas dépasser 15 p. 100.

4.3.2 Gélatine présentée à l'état liquide :

Dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre, placer environ 10 g de solution colloïdale de gélatine, peser exactement cette quantité en capsule couverte, dessécher sur bain d'eau à 100 °C durant 4 heures et terminer la dessiccation à l'étuve à 100-105°C durant 3 heures. Laisser refroidir en capsule couverte et en dessiccateur. Peser la quantité de résidu sec. Soit **p** g cette quantité; rapporté à 100 g de solution colloïdale, le résidu sec doit atteindre 5 p. 100 au minimum .

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

4.4 Cendres

Incinérer le résidu sec de l'essai alinéa 4.3 en le chauffant progressivement à 600 °C au four à moufle après avoir saupoudré la gélatine de 0,2 à 0,3 g de paraffine sans cendres destinée à éviter le débordement de la masse.

Le taux de cendres totales ne doit pas être supérieur à 2,0 p. 100.

4.5 Préparation de la solution pour essais

Après la pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau. Chauffer pour activer la dissolution et ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtention d'un volume égal à 25 fois le poids de gélatine sèche. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0,04 g de gélatine sèche.

4.6 Fer

10 ml de solution préparée pour essais (4.5) sont additionnés de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), d'une goutte de permanganate de potassium à 1 p. 100 (R) et de 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

Si une coloration rouge apparaît, elle doit être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 2 ml de solution de fer(III) à 0,010 g par litre (R), 5,2 ml d'eau et les mêmes volumes d'acide chlorhydrique concentré (R) et de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

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

Il est également possible de procéder au dosage du fer par spectrophotométrie d'absorption atomique (voir méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international).

4.7 Chrome

Dans une fiole conique de 50 ml, placer 10 ml de la solution préparée pour essais (4.5), 1 ml d'une solution de persulfate d'ammonium à 15 p. 100 (R), 0,5 ml d'une solution de nitrate d'argent à 1 p. 100 (R). Chauffer et ajouter goutte à goutte jusqu'à coloration rose persistante du permanganate de potassium en solution à 3 p. 100 (R). Mettre quelques gouttes en excès et maintenir une douce ébullition pendant 10 minutes. Si, au cours de l'ébullition, la solution se décolore, ajouter du permanganate de potassium. Après 10 minutes, introduire goutte à goutte de l'acide chlorhydrique dilué 1/10 (R) jusqu'à complète décoloration.

Après refroidissement, transvaser dans une fiole jaugée de 20 ml ajouter 2 ml de diphénylcarbazide en solution à 0,05 p. 100 dans l'alcool (R) et fraîchement préparée. Porter à 20 ml.

Si une coloration rouge violacé apparaît, elle doit être inférieure à celle obtenue en traitant 4 ml de solution de dichromate de potassium à 0,001 g de chrome par litre (R) par 2 ml d'acide sulfurique à 5 p. 100 (R), 5 ml d'eau distillée, en ajoutant après mélange 2 ml de solution de diphénylcarbazide à 0,05 p. 100 dans l'alcool (R) et en portant à 20 ml.

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

Il est également possible de procéder au dosage du chrome par spectrophotométrie d'absorption atomique (voir méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international).

4.8 Cuivre

2,5 ml de la solution préparée pour essais (4.5), sont placés dans un tube à essais avec 7,5 ml d'eau, 0,5 ml de solution citrique chlorhydrique (R), 1 ml d'hydroxyde d'ammonium 5 M (R), 0,5 ml de réactif au diéthyldithiocarbamate de sodium (R). Si une coloration jaune apparaît, elle ne doit pas être plus intense que celle obtenue en ajoutant à 3,5 ml d'une solution de cuivre à 1 mg par litre (R) portés à 10 ml, les mêmes volumes des mêmes réactifs.

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

Il est également possible de procéder au dosage du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique (voir méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international).

4.9 Zinc

1,25 ml de la solution préparée pour essais (4.5), sont additionnés de 3,75 ml d'eau distillée, 5 ml de solution tampon acétate (R), 1 ml de solution de thiosulfate de sodium à 25 p. 100 (m/v) (R), 5 ml de solution de dithizone à 25 mg par litre dans le dichlorométhane (R). Agiter pendant 2 minutes. Séparer la phase organique ; sa coloration doit être inférieure à celle obtenue en traitant avec les mêmes volumes des mêmes réactifs 2,5 ml de solution de zinc à 1 mg par litre (R).

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

Il est également possible de procéder au dosage du zinc par spectrophotométrie d'absorption atomique (voir méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international).

4.10 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (4.5), effectuer le dosage à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international par spectrophotométrie d'absorption atomique.

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

4.11 Mercure

Effectuer le dosage du mercure à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international par spectrophotométrie d'absorption atomique.

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

4.12 Arsenic

Effectuer le dosage de l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international par spectrophotométrie d'absorption atomique.

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

4.13 Cadmium

Effectuer le dosage du cadmium à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international par spectrophotométrie d'absorption atomique.

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

4.14 Dosage de l'azote total

Effectuer le dosage de l'azote total à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international. L'azote total doit être supérieur à 14 p. 100 du poids de gélatine sèche.

4.15 Dioxyde de soufre

Gélatine présentée sous forme sèche

Le dioxyde de soufre, libéré par un petit excès d'acide phosphorique, est entraîné à l'ébullition sous reflux par un courant d'azote, oxydé et fixé par une solution de peroxyde d'hydrogène, et dosé par acidimétrie en présence de bleu de bromophénol, selon la méthode de référence du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, avec une prise d'essai de 2 g de gélatine solide et sur 10 ml de solution diluée à 10 p. 100 de gélatine.

La teneur en dioxyde de soufre ne doit pas être supérieure à 50 mg/kg.

Gélatine présentée sous forme de solution colloïdale

Les formes liquides sont stabilisées avec du SO_2 et ne doivent pas contenir d'alcool benzylique ; la teneur en dioxyde de soufre ne doit pas être supérieure à 4 g/litre.

4.16 Urée

Effectuer le dosage de l'urée à l'aide de la méthode enzymatique de Boehringer. La teneur doit être inférieure à 2,5 g/kg.

4.17 Contrôle bactériologique

Procéder comme il est indiqué au Chapitre II du Codex œnologique international .

Limite : micro-organismes viables totaux : moins de 10^4 UFC/g

4.18 *Escherichia coli*

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.19 Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.20 Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.21 Spores de microorganismes d'anaérobies sulfito-réducteurs[14]

Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

[14] Méthode à définir ultérieurement par le groupe d'experts « Microbiologie du vin »

4.22 Spores de *Clostridium perfringen*[15]

Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.23 Staphylocoques (*Staphylococcus aureus*)

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.24 Levures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation.

4.25 Bactéries lactiques totales

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation.

4.26 Bactéries acétiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation.

4.27 Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au Chapitre II du Codex Œnologique International

Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation.

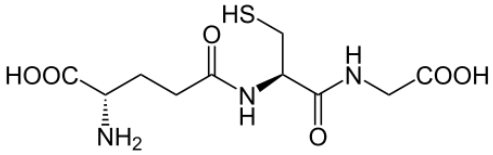
5. CONSERVATION

La gélatine solide doit être conservée en récipient clos ou en sac imperméable à l'humidité dans des locaux tempérés.

Les gélatines présentées en solutions colloïdales prêtes à l'emploi peuvent contenir des agents conservateurs autorisés dans les vins et leurs concentrations doivent être mentionnées sur l'étiquette.

[15] Méthode à définir ultérieurement par le groupe d'experts « Microbiologie du vin »

Glutathion
Nom chimique : **γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine**



$C_{10}H_{17}N_3O_6S$

Numéro CAS : 70-18-8
Masse moléculaire : 307,33 g/mol

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide biologiquement actif composé de L-glutamate, de L-cystéine et de glycine. Ses propriétés antioxydantes sont susceptibles de lutter contre les phénomènes d'oxydation dans les moûts et les vins et de protéger les composés aromatiques.

Le GSH est produit principalement par fermentation microbienne. Les méthodes de production chimique et par réaction enzymatique plus onéreuses ne sont pas mises en œuvre à l'échelle industrielle.

Les productions par fermentation microbienne utilisent couramment S*accharomyces cerevisiae* et *Candida utilis* ou d'autres micro-organismes non-*Saccharomyces*, et plus généralement leurs mutants. Les teneurs en GSH par cultures des levures de souches mutantes sont habituellement élevées (entre 3,5 et 9 % du poids cellulaire sec).

Lorsque les mutants utilisés pour la production de GSH proviennent de levures génétiquement modifiées, ils doivent bénéficier d'une autorisation d'utilisation préalable de la part des autorités compétentes.

2. ÉTIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner :

- le nom ou la dénomination de vente,
- indication « produit destiné à un usage œnologique, utilisation limitée »,
- la teneur en GSH,
- les additifs éventuels,
- le mode d'emploi,
- le numéro de lot ainsi que la date d'expiration et les conditions de conservation dans des conditions définies de température, d'humidité et de ventilation,
- le nom du genre et de l'espèce des sources microbiennes (uniquement en cas de production par fermentation microbienne),
- l'indication que le GSH est produit par des mutants obtenus par modification génétique ainsi que le caractère modifié si cela est le cas (uniquement en cas de production par fermentation microbienne),
- le nom ou la raison sociale et l'adresse du fabricant, du conditionneur ou du vendeur,
- la quantité nette.

3. CARACTÈRES

Le GSH se présente généralement sous la forme d'une poudre blanche cristalline soluble dans l'eau, donnant une solution aqueuse limpide et incolore présentant un léger goût de réduit. Il convient de prendre des précautions (point 4.3 et point 6.) pour garantir la stabilité du GSH afin d'éviter l'auto-oxydation et la production de glutathion oxydé (GSSG).

3.1.Identification

3.1.1. Pouvoir rotatoire

Pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D$ 25 : -18,9° (c = 4,653 % à T = 25 °C)

3.1.2 Point de fusion

190 - 195 °C

4. LIMITES ET MÉTHODES D'ESSAI

4.1 Dosage du GSH

Les concentrations en glutathion réduit (GSH) sont mesurées par la méthode d'électrophorèse capillaire décrite en annexe.
La teneur en glutathion réduit doit être ≥ 98 %.

4.2 Humidité

Elle est mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant (environ 3 heures). La teneur maximale en humidité de la forme solide doit être inférieure ou égale à 0,5 %.

4.3 Solution pour essais

Dissoudre 1 g de GSH dans 100 mL d'eau ultra-pure de type I. La solution de GSH doit être préparée chaque jour et conservée à basse température (2-4 °C) dans une bouteille en verre brun.

4.4 Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II *du Codex œnologique international*. La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.5 Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg de matière sèche.

4.6 Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg de matière sèche.

4.7 Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg de matière sèche.

4.8 Levures vivantes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. Le nombre de levures vivantes doit être inférieur ou égal à 10^2 UFC/g.

4.9 Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. Le nombre de moisissures doit être inférieur à 10^2 UFC/g.

4.10 Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international.* Le nombre de bactéries lactiques doit être inférieur à 10^3 UFC/g.

4.11 Bactéries acétiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. Le nombre de bactéries acétiques doit être inférieur à 10^3 UFC/g.

4.12 Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.13 Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.14 Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre

II du *Codex œnologique international*. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.15 Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. Le nombre de coliformes doit être inférieur à 10 UFC/g.

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Conserver dans un emballage scellé. Stocker dans un endroit frais (2-8 °C) et sec. Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant.

Annexe

Dosage du glutathion (GSH) dans les préparations commerciales par électrophorèse capillaire

Ce dosage est effectué selon la méthode de détermination du glutathion dans les moûts et les vins (Résolution OIV-OENO 345-2009).

Les échantillons de glutathion à doser sont préparés par dilution de la solution pour essais (point 4.3 de la monographie du glutathion) afin d'obtenir une concentration finale de l'ordre de 20 mg/L (par exemple 200 µL dans 100 mL d'eau ulta-pure (si le taux de glutathion dans la préparation commerciale est proche de 100 %). Si nécessaire, cette préparation est clarifiée par centrifugation avant d'être analysée.

1. CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

Certains éléments de validation internes ont été déterminés dans la matrice vin (Résolution OIV-OENO 345-2009) pour réaliser les courbes d'étalonnage et les tests de répétabilité. Chaque concentration est calculée à partir de la moyenne de trois déterminations obtenues en utilisant la droite de régression de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en mg/L. La régression linéaire et le coefficient de corrélation sont calculés selon la méthode des moindres carrés. La solution mère de glutathion est réalisée à partir d'une solution d'HCl/EDTA permettant de la conserver sans perte plusieurs jours à +6 °C. Des dilutions successives de cette solution permettent d'estimer le seuil limite de détection de la méthode, pour un rapport signal sur bruit supérieur ou égal à trois.

La courbe d'étalonnage est établiée entre 0 à 40 mg/L, la régression linéaire est égale à $Y = 0,583X - 0,948$, et le coefficient de corrélation est 0,9966.

Ces conditions d'analyse permettent d'éliminer les interférences provoquées par les produits d'hydrolyse du MBB.

La répétabilité de la méthode, calculée à partir de dix analyses d'un même échantillon de vin, pour une concentration de 10 mg/L, montre un coefficient de variation de 6,0 % pour le glutathion.

La limite de détection du glutathion est de 20 µg/L (dans le vin) et sa limite de quantification est de 60 µg/L.

2. BIBLIOGRAPHIE

Voir résolution OIV-OENO 345-2009.

SUCRE DE RAISIN
(MOUTS DE RAISIN CONCENTRES RECTIFIES)

(Oeno 47/2000, Oeno 419A-2011, Oeno 419B-2012)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le sucre de raisin est obtenu exclusivement à partir du moût de raisin. Son addition au vin est soumise à réglementation.

L'étiquetage ou, à défaut, le document d'accompagnement des récipients contenant le sucre raisin doit mentionner la richesse en sucre.

2. CARACTERES

Liquide sirupeux, blanc laiteux ou légèrement jaunâtre, saveur sucrée.

Indice de réfraction à 20°C	1,42410 - 1,46663
Sucres totaux exprimés en sucre inverti	63 % m/m minimum
Absorbance à 425 nm sous 1 cm à 25° Brix	maximum 0,100
pH à 25° Brix	maximum 5*
Acidité de titration en méq/kg de sucre	maximum 15*
Saccharose	négatif par la méthode préconisée
Dioxyde de soufre en mg/kg de sucre	maximum 25
Indice de Folin-Ciocalteu à 25° Brix	maximum 6
Cations totaux en méq/kg de sucre	maximum 8
Conductivité à 25° Brix et 20°C en micro-Siemens par cm (μScm^{-1})	maximum 120
5-(hydroxyméthyl)furfural en mg/kg de sucre	maximum 25
Ethanol résiduel g/kg de sucre	maximum 8
Métaux lourds en mg/kg de sucre de raisin exprimés en plomb	inférieurs à 10
Absence d'antiseptiques et antiferments	

1° Brix = 1 g de sucre dans 100 g de solution.

* après élimination du dioxyde de carbone par le vide.

3. ESSAIS

3.1 Préparation de l'échantillon

La prise d'échantillon pour les différents dosages étant difficile, il est conseillé de préparer les deux dilutions suivantes :

3.1.1 - **Solution principale I**, pour les déterminations suivantes: acidité de titration, dioxyde de soufre total, cations totaux

Peser exactement 200 g de sucre de raisin. Porter au volume de 500 ml avec l'eau.

3.1.2 - **Solution principale II**, nécessaire pour les déterminations suivantes : indice de Folin-Ciocalteu, pH, conductivité, recherche du saccharose, absorbance à 425 nm

Diluer le sucre de raisin avec de l'eau jusqu'à porter la concentration à 25° Brix ± 0,5° Brix (25 g de sucre dans 100 g de solution).

3.2 Indice de réfraction à 20°C (sucres totaux)

3.2.1 Appareillage :

Le réfractomètre utilisé donne, selon le type de graduation

- soit 0,1 % en masse de saccharose (ou matières sèches ou degrés Brix)
- soit la 5ème décimale de l'indice de réfraction.

Le réfractomètre utilisé doit être pourvu d'un thermomètre (+ 10 °C à + 30°C).

3.2.2 Mode opératoire :

Déposer deux gouttes de sucre de raisin sur la surface de verre du prisme fixe, rabattre le prisme mobile et diriger l'instrument vers une source lumineuse qui éclaire l'échelle graduée. Observer alors sur cette échelle une ligne de séparation entre une zone inférieure claire et une zone supérieure obscure, lire la graduation à laquelle se place cette limite et relever la température t °C.

3*.2.3 Calcul :*

Si l'appareil est gradué en pour cent (m/m) de saccharose (ou matières sèches ou degrés Brix), la mesure ramenée à 20°C à l'aide de la table 2 est reportée dans la table 1 qui donne (colonne 3) la teneur en sucres totaux en pour cent (m/m) exprimée en sucre.

Si l'appareil est gradué en indice de réfraction, l'indice mesuré à t °C est reporté dans la table 1 pour obtenir (colonne 1) la valeur correspondante en pour cent (m/m) de saccharose à t °C. Cette valeur exprimée à 20°C au moyen de la table de correction de température n°2 est reportée dans la table 1 qui donne (colonne 3) la teneur en sucres totaux en pour cent (m/m) de sucre inverti.

Pour obtenir l'indice de réfraction à 20°C, reporter la teneur en sucres totaux exprimée en sucre inverti dans la table 1.

3.2.4 Expression des résultats :

La teneur en sucres totaux exprimée en p. 100 en masse de saccharose est donnée avec une décimale.

L'indice de réfraction à 20°C est donné avec 5 décimales.

3.3 Absorbance à 425 nm de la solution à 25° Brix (Caractéristiques chromatiques)[16].

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-08).

3.4 Mesure du pH[17]

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-06).

3.5 Acidité de titration[18]

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-05).

3.6 Recherche du saccharose par chromatographie liquide à haute performance[19]

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-04).

3.7 Dioxyde de soufre[20]

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-07).

3.8 Indice de Folin-Ciocalteu de la solution à 25° Brix

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire en respectant l'ordre suivant :

. 5 ml de solution principale II (3.1.2)

. 50 ml d'eau

. 5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (R)

. 20 ml de solution de carbonate de sodium (R).

Porter à 100 ml avec de l'eau. Agiter pour homogénéiser. Attendre 30 minutes pour avoir une stabilisation de la réaction.

Déterminer l'absorbance à 750 nm sous 1 cm par rapport à un témoin préparé avec de l'eau à la place de la solution principale II.

Expression des résultats :

Exprimer les résultats sous la forme d'un indice obtenu en multipliant l'absorbance par 16 de façon à avoir une échelle comparable à celle utilisée dans le cas des vins.

[16] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011
[17] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011
[18] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011
[19] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011
[20] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011

3.9 Cations totaux[21]

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-09).

3.10 Conductivité de la solution à 25° Brix[22]

Effectuer la mesure selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-01).

3.11 5-(Hydroxyméthyl)furfural (HMF)[23]

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-02).

3.12 Métaux lourds

Effectuer la mesure selon les méthodes décrites au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-10 ou méthode OIV-MA-F1-11)

(Teneur en métaux lourds exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

3.13 Plomb[24]

Effectuer la mesure selon les méthodes décrites au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-10 ou méthode OIV-MA-F1-11) (Teneur en Plomb, inférieure à 1 mg/kg)

3.14 Mercure

A partir de la solution principale I (3.1.1) doser le mercure selon la méthode en annexe (Teneur en mercure inférieure à 0,3 mg/kg)

3.15 Arsenic

A partir de la solution principale I (3.1.1) doser l'arsenic selon la méthode en annexe (Teneur en arsenic inférieure à 0,5 mg/kg)

3.16 Ethanol[25]

Procéder au dosage selon la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (méthode OIV-MA-F1-03).

3.17 Méso-inositol

Chromatographie en phase gazeuse d'un dérivé silylé.

[21] Modifié par la résolution OIV-OENO 419B-2012
[22] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011
[23] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011
[24] Modifié par la résolution OIV-OENO 419B-2012
[25] Modifié par la résolution OIV-OENO 419A-2011

***Remarque** : Les informations ci-dessous sont données à titre indicatif, il existe d'autres techniques de dérivation des sucres et polyols ainsi que d'autres techniques chromatographiques pour doser le mésoinositol.*

3.17.1 Préparation de l'échantillon :

5 g de sucre de raisin sont dilués à 50 ml dans de l'eau. 50 µl de la dilution et 50 µl d'une solution de méthyl D-glucopyranoside à 1 g/litre (étalon interne) sont séchés sous vide dans un petit flacon de 2 ml.

Dissoudre le résidu par 100 µl de pyridine, ajouter 100 µl de triméthylchlorosilane, fermer le petit flacon par un bouchon de téflon et chauffer pendant 1 heure à 80°C. Injecter 1 µl avec division du volume injecté au 1/60.

3.17.2 Séparation :

Colonne : de type capillaire apolaire en silice fondue de 25 m de long et de 0,2 mm de diamètre interne.

Gaz vecteur : hélium 1 ml/minute

Injecteur et détecteur : 280°C

Température de la colonne : de 60°C à 250°C, à 4°C/minute, puis isotherme à 250°C.

3.17.3 Expression des résultats : en g par kg de sucre.

4. CONSERVATION

Le sucre de raisin doit être conservé dans des récipients étanche et à température ambiante à partir de la production.

ANNEXE I (sucres)

TABLE 1

Teneur en sucres des moûts par réfractométrie

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20°C	Masse volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
50.0	1.42008	1.2342	627.6	508.5
50.1	1.42029	1.2348	629.3	509.6
50.2	1.42050	1.2355	630.9	510.6
50.3	1.42071	1.2362	632.4	511.6
50.4	1.42092	1.2367	634.1	512.7
50.5	1.42113	1.2374	635.7	513.7
50.6	1.42135	1.2381	637.3	514.7
50.7	1.42156	1.2386	638.7	515.7
50.8	1.42177	1.2391	640.4	516.8
50.9	1.42198	1.2396	641.9	517.8
51.0	1.42219	1.2401	643.4	518.8
51.1	1.42240	1.2406	645.0	519.9
51.2	1.42261	1.2411	646.5	520.9
51.3	1.42282	1.2416	648.1	522.0
51.4	1.42304	1.2421	649.6	523.0
51.5	1.42325	1.2427	651.2	524.0
51.6	1.42347	1.2434	652.9	525.1
51.7	1.42368	1.2441	654.5	526.1
51.8	1.42389	1.2447	656.1	527.1
51.9	1.42410	1.2454	657.8	528.2
52.0	1.42432	1.2461	659.4	529.2
52.1	1.42453	1.2466	661.0	530.2
52.2	1.42475	1.2470	662.5	531.3
52.3	1.42496	1.2475	664.1	532.3
52.4	1.42517	1.2480	665.6	533.3
52.5	1.42538	1.2486	667.2	534.4
52.6	1.42560	1.2493	668.9	535.4
52.7	1.42581	1.2500	670.5	536.4
52.8	1.42603	1.2506	672.2	537.5
52.9	1.42624	1.2513	673.8	538.5
53.0	1.42645	1.2520	675.5	539.5
53.1	1.42667	1.2525	677.1	540.6
53.2	1.42689	1.2530	678.5	541.5
53.3	1.42711	1.2535	680.2	542.6
53.4	1.42733	1.2540	681.8	543.7
53.5	1.42754	1.2546	683.4	544.7
53.6	1.42776	1.2553	685.1	545.8
53.7	1.42797	1.2560	686.7	546.7
53.8	1.42819	1.2566	688.4	547.8
53.9	1.42840	1.2573	690.1	548.9
54.0	1.42861	1.2580	691.7	549.8

54.1	1.42884	1.2585	693.3	550.9

TABLE 1 (Suite)

Saccharose % (m/M)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
54.2	1.42906	1.2590	694.9	551.9
54.3	1.42927	1.2595	696.5	553.0
54.4	1.42949	1.2600	698.1	554.0
54.5	1.42971	1.2606	699.7	555.1
54.6	1.42993	1.2613	701.4	556.1
54.7	1.43014	1.2620	703.1	557.1
54.8	1.43036	1.2625	704.7	558.2
54.9	1.43058	1.2630	706.2	559.1
55.0	1.43079	1.2635	707.8	560.2
55.1	1.43102	1.2639	709.4	561.3
55.2	1.43124	1.2645	711.0	562.3
55.3	1.43146	1.2652	712.7	563.3
55.4	1.43168	1.2659	714.4	564.3
55.5	1.43189	1.2665	716.1	565.4
55.6	1.43211	1.2672	717.8	566.4
55.7	1.43233	1.2679	719.5	567.5
55.8	1.43255	1.2685	721.1	568.5
55.9	1.43277	1.2692	722.8	569.5
56.0	1.43298	1.2699	724.5	570.5
56.1	1.43321	1.2703	726.1	571.6
56.2	1.43343	1.2708	727.7	572.6
56.3	1.43365	1.2713	729.3	573.7
56.4	1.43387	1.2718	730.9	574.7
56.5	1.43409	1.2724	732.6	575.8
56.6	1.43431	1.2731	734.3	576.8
56.7	1.43454	1.2738	736.0	577.8
56.8	1.43476	1.2744	737.6	578.8
56.9	1.43498	1.2751	739.4	579.9
57.0	1.43519	1.2758	741.1	580.9
57.1	1.43542	1.2763	742.8	582.0
57.2	1.43564	1.2768	744.4	583.0
57.3	1.43586	1.2773	745.9	584.0
57.4	1.43609	1.2778	747.6	585.1
57.5	1.43631	1.2784	749.3	586.1
57.6	1.43653	1.2791	751.0	587.1
57.7	1.43675	1.2798	752.7	588.1
57.8	1.43698	1.2804	754.4	589.2
57.9	1.43720	1.2810	756.1	590.2
58.0	1.43741	1.2818	757.8	591.2
58.1	1.43764	1.2822	759.5	592.3
58.2	1.43784	1.2827	761.1	593.4
58.3	1.43809	1.2832	762.6	594.3
58.4	1.43832	1.2837	764.3	595.4

58.5	1.43854	1.2843	766.0	596.4

TABLE 1 (Suite)

Saccharose % (m/M)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
58.6	1.43877	1.2850	767.8	597.5
58.7	1.43899	1.2857	769.5	598.5
58.8	1.43922	1.2863	771.1	599.5
58.9	1.43944	1.2869	772.9	600.6
59.0	1.43966	1.2876	774.6	601.6
59.1	1.43988	1.2882	776.3	602.6
59.2	1.44011	1.2889	778.1	603.7
59.3	1.44034	1.2896	779.8	604.7
59.4	1.44057	1.2902	781.6	605.8
59.5	1.44079	1.2909	783.3	606.8
59.6	1.44102	1.2916	785.2	607.9
59.7	1.44124	1.2921	786.8	608.9
59.8	1.44147	1.2926	788.4	609.9
59.9	1.44169	1.2931	790.0	610.9
60.0	1.44192	1.2936	791.7	612.0
60.1	1.44215	1.2942	793.3	613.0
60.2	1.44238	1.2949	795.2	614.1
60.3	1.44260	1.2956	796.9	615.1
60.4	1.44283	1.2962	798.6	616.1
60.5	1.44305	1.2969	800.5	617.2
60.6	1.44328	1.2976	802.2	618.2
60.7	1.44351	1.2981	803.9	619.3
60.8	1.44374	1.2986	805.5	620.3
60.9	1.44397	1.2991	807.1	621.3
61.0	1.44419	1.2996	808.7	622.3
61.1	1.44442	1.3002	810.5	623.4
61.2	1.44465	1.3009	812.3	624.4
61.3	1.44488	1.3016	814.2	625.5
61.4	1.44511	1.3022	815.8	626.5
61.5	1.44534	1.3029	817.7	627.6
61.6	1.44557	1.3036	819.4	628.6
61.7	1.44580	1.3042	821.3	629.7
61.8	1.44603	1.3049	823.0	630.7
61.9	1.44626	1.3056	824.8	631.7
62.0	1.44648	1.3062	826.6	632.8
62.1	1.44672	1.3068	828.3	633.8
62.2	1.44695	1.3075	830.0	634.8
62.3	1.44718	1.3080	831.8	635.9
62.4	1.44741	1.3085	833.4	636.9
62.5	1.44764	1.3090	835.1	638.0

62.6	1.44787	1.3095	836.8	639.0

TABLE 1 (Suite)

Saccharose % (m/M)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
62.7	1.44810	1.3101	838.5	640.0
62.8	1.44833	1.3108	840.2	641.0
62.9	1.44856	1.3115	842.1	642.1
63.0	1.44879	1.3121	843.8	643.1
63.1	1.44902	1.3128	845.7	644.2
63.2	1.44926	1.3135	847.5	645.2
63.3	1.44949	1.3141	849.3	646.3
63.4	1.44972	1.3148	851.1	647.3
63.5	1.44955	1.3155	853.0	648.4
63.6	1.45019	1.3161	854.7	649.4
63.7	1.45042	1.3168	856.5	650.4
63.8	1.45065	1.3175	858.4	651.5
63.9	1.45088	1.3180	860.0	652.5
64.0	1.45112	1.3185	861.6	653.5
64.1	1.45135	1.3190	863.4	654.6
64.2	1.45158	1.3195	865.1	655.6
64.3	1.45181	1.3201	866.9	656.7
64.4	1.45205	1.3208	868.7	657.7
64.5	1.45228	1.3215	870.6	658.8
64.6	1.45252	1.3221	872.3	659.8
64.7	1.45275	1.3228	874.1	660.8
64.8	1.45299	1.3235	876.0	661.9
64.9	1.45322	1.3241	877.8	662.9
65.0	1.45347	1.3248	879.7	664.0
65.1	1.45369	1.3255	881.5	665.0
65.2	1.45393	1.3261	883.2	666.0
65.3	1.45416	1.3268	885.0	667.0
65.4	1.45440	1.3275	886.9	668.1
65.5	1.45463	1.3281	888.8	669.2
65.6	1.45487	1.3288	890.6	670.2
65.7	1.45510	1.3295	892.4	671.2
65.8	1.45534	1.3301	894.2	672.3
65.9	1.45557	1.3308	896.0	673.3
66.0	1.45583	1.3315	898.0	674.4
66.1	1.45605	1.3320	899.6	675.4
66.2	1.45629	1.3325	901.3	676.4
66.3	1.45652	1.3330	903.1	677.5
66.4	1.45676	1.3335	904.8	678.5

66.5	1.45700	1.3341	906.7	679.6

TABLE 1 (Suite)

Saccharose % (m/M)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
66.6	1.45724	1.3348	908.5	680.6
66.7	1.45747	1.3355	910.4	681.7
66.8	1.45771	1.3361	912.2	682.7
66.9	1.45795	1.3367	913.9	683.7
67.0	1.45820	1.3374	915.9	684.8
67.1	1.45843	1.3380	917.6	685.8
67.2	1.45867	1.3387	919.6	686.9
67.3	1.45890	1.3395	921.4	687.9
67.4	1.45914	1.3400	923.1	688.9
67.5	1.45938	1.3407	925.1	690.0
67.6	1.45962	1.3415	927.0	691.0
67.7	1.45986	1.3420	928.8	692.1
67.8	1.46010	1.3427	930.6	693.1
67.9	1.46034	1.3434	932.6	694.2
68.0	1.46060	1.3440	934.4	695.2
68.1	1.46082	1.3447	936.2	696.2
68.2	1.46106	1.3454	938.0	697.2
68.3	1.46130	1.3460	939.9	698.3
68.4	1.46154	1.3466	941.8	699.4
68.5	1.46178	1.3473	943.7	700.4
68.6	1.46202	1.3479	945.4	701.4
68.7	1.46226	1.3486	947.4	702.5
68.8	1.46251	1.3493	949.2	703.5
68.9	1.46275	1.3499	951.1	704.6
69.0	1.46301	1.3506	953.0	705.6
69.1	1.46323	1.3513	954.8	706.6
69.2	1.46347	1.3519	956.7	707.7
69.3	1.46371	1.3526	958.6	708.7
69.4	1.46396	1.3533	960.6	709.8
69.5	1.46420	1.3539	962.4	710.8
69.6	1.46444	1.3546	964.3	711.9
69.7	1.46468	1.3553	966.2	712.9
69.8	1.46493	1.3560	968.2	714.0
69.9	1.46517	1.3566	970.0	715.0
70.0	1.46544	1.3573	971.8	716.0
70.1	1.46565	1.3579	973.8	717.1
70.2	1.46590	1.3586	975.6	718.1
70.3	1.46614	1.3593	977.6	719.2

70.4	1.46639	1.3599	979.4	720.2

TABLE 1 (Suite)

Saccharose % (m/M)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
70.5	1.46663	1.3606	981.3	721.2
70.6	1.46688	1.3613	983.3	722.3
70.7	1.46712	1.3619	985.2	723.4
70.8	1.46737	1.3626	987.1	724.4
70.9	1.46761	1.3633	988.9	725.4
71.0	1.46789	1.3639	990.9	726.5
71.1	1.46810	1.3646	992.8	727.5
71.2	1.46835	1.3653	994.8	728.6
71.3	1.46859	1.3659	996.6	729.6
71.4	1.46884	1.3665	998.5	730.7
71.5	1.46908	1.3672	1000.4	731.7
71.6	1.46933	1.3678	1002.2	732.7
71.7	1.46957	1.3685	1004.2	733.8
71.8	1.46982	1.3692	1006.1	734.8
71.9	1.47007	1.3698	1008.0	735.9
72.0	1.47036	1.3705	1009.9	736.9
72.1	1.47056	1.3712	1012.0	738.0
72.2	1.47081	1.3718	1013.8	739.0
72.3	1.47106	1.3725	1015.7	740.0
72.4	1.47131	1.3732	1017.7	741.1
72.5	1.47155	1.3738	1019.5	742.1
72.6	1.47180	1.3745	1021.5	743.2
72.7	1.47205	1.3752	1023.4	744.2
72.8	1.47230	1.3758	1025.4	745.3
72.9	1.47254	1.3765	1027.3	746.3
73.0	1.47284	1.3772	1029.3	747.4
73.1	1.47304	1.3778	1031.2	748.4
73.2	1.47329	1.3785	1033.2	749.5
73.3	1.47354	1.3792	1035.1	750.5
73.4	1.47379	1.3798	1037.1	751.6
73.5	1.47404	1.3805	1039.0	752.6
73.6	1.47429	1.3812	1040.9	753.6
73.7	1.47454	1.3818	1042.8	754.7
73.8	1.47479	1.3825	1044.8	755.7
73.9	1.47504	1.3832	1046.8	756.8
74.0	1.47534	1.3838	1048.6	757.8
74.1	1.47554	1.3845	1050.7	758.9
74.2	1.47579	1.3852	1052.6	759.9

74.3	1.47604	1.3858	1054.6	761.0

TABLE 1 (Fin)

Saccharose % (m/M)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
74.4	1.47629	1.3865	1056.5	762.0
74.5	1.47654	1.3871	1058.5	763.1
74.6	1.47679	1.3878	1060.4	764.1
74.7	1.47704	1.3885	1062.3	765.1
74.8	1.47730	1.3892	1064.4	766.2
74.9	1.47755	1.3898	1066.3	767.2
75.0	1.47785	1.3905	1068.3	768.3

TABLE 2

Correction du titre massique en sucre conventionnel en fonction de la température

	Titre massique mesuré en %													
Température °C	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
5	–0,82	–0,87	–0,92	–0,95	–0,99									
6	–0,80	–0,82	–0,87	–0,90	–0,94									
7	–0,74	–0,78	–0,82	–0,84	–0,88									
8	–0,69	–0,73	–0,76	–0,79	–0,82									
9	–0,64	–0,67	–0,71	–0,73	–0,75									
10	–0,59	–0,62	–0,65	–0,67	–0,69	–0,71	–0,72	–0,73	–0,74	–0,75	–0,75	–0,75	–0,75	–0,75
11	–0,54	–0,57	–0,59	–0,61	–0,63	–0,64	–0,65	–0,66	–0,67	–0,68	–0,68	–0,68	–0,68	–0,67
12	–0,49	–0,51	–0,53	–0,55	–0,56	–0,57	–0,58	–0,59	–0,60	–0,60	–0,61	–0,61	–0,60	–0,60
13	–0,43	–0,45	–0,47	–0,48	–0,50	–0,51	–0,52	–0,52	–0,53	–0,53	–0,53	–0,53	–0,53	–0,53
14	–0,38	–0,39	–0,40	–0,42	–0,43	–0,44	–0,44	–0,45	–0,45	–0,46	–0,46	–0,46	–0,46	–0,45
15	–0,32	–0,33	–0,34	–0,35	–0,36	–0,37	–0,37	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38
16	–0,26	–0,27	–0,28	–0,28	–0,29	–0,30	–0,30	–0,30	–0,31	–0,31	–0,31	–0,31	–0,31	–0,30
17	–0,20	–0,20	–0,21	–0,21	–0,22	–0,22	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23
18	–0,13	–0,14	–0,14	–0,14	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15
19	–0,07	–0,07	–0,07	–0,07	–0,07	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08
20	0	RÉFÉRENCE												0
21	+0,07	+0,07	+0,07	+0,07	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08
22	+0,14	+0,14	+0,15	+0,15	+0,15	+0,15	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,15	+0,15
23	+0,21	+0,22	+0,22	+0,23	+0,23	+0,23	+0,23	+0,24	+0,24	+0,24	+0,24	+0,23	+0,23	+0,23
24	+0,29	+0,29	+0,30	+0,30	+0,31	+0,31	+0,31	+0,32	+0,32	+0,32	+0,32	+0,31	+0,31	+0,31
25	+0,36	+0,37	+0,38	+0,38	+0,39	+0,39	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,39	+0,39	+0,39
26	+0,44	+0,45	+0,46	+0,46	+0,47	+0,47	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,47	+0,47	+0,46
27	+0,52	+0,53	+0,54	+0,55	+0,55	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,55	+0,55	+0,54
28	+0,60	+0,61	+0,62	+0,63	+0,64	+0,64	+0,64	+0,65	+0,65	+0,64	+0,64	+0,64	+0,63	+0,62
29	+0,68	+0,69	+0,70	+0,71	+0,72	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,72	+0,72	+0,71	+0,70
30	+0,77	+0,78	+0,79	+0,80	+0,81	+0,81	+0,81	+0,82	+0,81	+0,81	+0,81	+0,80	+0,79	+0,78
31	+0,85	+0,87	+0,88	+0,89	+0,89	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,89	+0,88	+0,87	+0,86
32	+0,94	+0,95	+0,96	+0,97	+0,98	+0,99	+0,99	+0,99	+0,99	+0,98	+0,97	+0,96	+0,95	+0,94
33	+1,03	+1,04	+1,05	+1,06	+1,07	+1,08	+1,08	+1,08	+1,07	+1,07	+1,06	+1,05	+1,03	+1,02
34	+1,12	+1,19	+1,15	+1,15	+1,16	+1,17	+1,17	+1,17	+1,16	+1,15	+1,14	+1,13	+1,12	+1,10
35	+1,22	+1,23	+1,24	+1,25	+1,25	+1,26	+1,26	+1,25	+1,25	+1,24	+1,23	+1,21	+1,20	+1,18
36	+1,31	+1,32	+1,33	+1,34	+1,35	+1,35	+1,35	+1,35	+1,34	+1,33	+1,32	+1,30	+1,28	+1,26
37	+1,41	+1,42	+1,43	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,43	+1,42	+1,40	+1,38	+1,36	+1,34
38	+1,51	+1,52	+1,53	+1,53	+1,54	+1,54	+1,53	+1,53	+1,52	+1,51	+1,49	+1,47	+1,45	+1,42
39	+1,61	+1,62	+1,62	+1,63	+1,63	+1,63	+1,63	+1,62	+1,61	+1,60	+1,58	+1,56	+1,53	+1,50
40	+1,71	+1,72	+1,72	+1,73	+1,73	+1,73	+1,72	+1,71	+1,70	+1,69	+1,67	+1,64	+1,62	+1,59

TABLE 3

Corrections de la conductivité pour les températures différentes de 20°C, en μ Siemens cm $^{-1}$

Températures										
	20,2	20,4	20,26	20,8	21,0	21,2	21,4	21,6	21,8	22,0(1)
	19,8	19,6	19,4	19,2	19,0	18,8	18,6	18,4	18,2	18,0(2)
Conductivité										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2
100	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4
150	1	1	2	3	3	4	5	5	6	7
200	1	2	3	3	4	5	6	7	8	9
250	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11
300	1	3	4	5	7	8	9	11	12	13
350	1	3	5	6	8	9	11	12	14	15
400	2	3	5	7	9	11	12	14	16	18
450	2	3	6	8	10	12	14	16	18	20
500	2	4	7	9	11	13	15	18	20	22
550	2	5	7	10	12	14	17	19	22	24
600	3	5	8	11	13	16	18	21	24	26

(1) Soustraire la correction

(2) Ajouter la correction

GOMME ARABIQUE
Gumme arabicum
Acaciae gummi
N° SIN: 414
(Oeno 27/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La gomme dite arabique est une exsudation gommeuse, durcie à l'air, s'écoulant naturellement ou par incision du tronc et des branches d'*Acacia senegal* L. Willdenow et d'autres espèces d'*Acacia* d'origine africaine. Elle est constituée de larmes sphériques, ovales parfois irrégulières, d'un diamètre de 1 à 3 cm.

Cette gomme arabique est présentée soit sous forme de poudre soit en solution colloïdale.

Produit destiné à améliorer la stabilité des vins en bouteilles.

La gomme arabique est constituée d'un polysaccharide riche en galactose et arabinose et d'une petite fraction protéique qui lui confèrent son pouvoir stabilisant vis à vis des précipitations de matières colorantes et des casses ferriques et cuivreuses.

Il existe des limites concernant la dose gomme arabique utilisable dans les vins

2. ETIQUETAGE

La concentration des solutions de gomme arabique, la teneur en dioxyde de soufre doivent être indiquées (Il existe des limites concernant la dose en dioxyde de soufre des vins), ainsi que les conditions de la conservation.

3. CARACTERES

Les larmes de gomme arabique sont plus ou moins friables se brisant en fragments à cassure nette. Les larmes entières présentent souvent une petite cavité centrale.

La gomme arabique en poudre est inodore, insipide et de couleur blanche ou jaunâtre d'éclat vitreux et transparent. Elle se dissout lentement dans 2 fois son poids d'eau en ne laissant qu'un faible résidu de débris végétaux. Elle est insoluble dans l'alcool.

La gomme arabique en solution est un liquide blanc jaunâtre, visqueux, translucide, légèrement acide ; elle précipite abondamment quand on rajoute un égal volume d'éthanol.

4. ESSAIS

4.1 Perte à la dessiccation

4.1.1 Gomme arabique en poudre :

Mettre 5 g de gomme arabique 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 Gomme arabique en solution :

Placer 10 g de gomme arabique en solution 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 4 p. 100.

4.3 Préparation de la solution pour essais

Les cendres de 5 g de gomme arabique en poudre ou celles obtenues à partir d'un poids de solution correspondant à 5 g de gomme solide sont reprises par 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R); porter sur un bain d'eau à 100°C en agitant avec un agitateur pour favoriser la solubilisation. Transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml et porter à 50 ml avec les eaux de rinçage de la capsule ayant servi à l'incinération.

4.4 Fer

A 10 ml de la solution préparée pour essais selon (4.3), ajouter 1 goutte de permanganate de potassium à 1 p. 100 (R), 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration obtenue doit être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 6 ml d'une solution de fer(III) à 10 mg de fer par litre (R), 4 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). (Teneur en fer inférieure à 60 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

4.5 Cadmium

Sur la solution préparée pour essais (4.3), doser le cadmium selon la méthode décrite en annexe (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

4.6 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (4.3), rechercher le plomb par la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

4.7 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (4.3), rechercher le mercure selon la méthode décrite en annexe, (teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

4.8 Arsenic

Minéraliser par la méthode nitrosulfurique 0,5 g de gomme arabique sèche et rechercher l'arsenic comme il est indiqué en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

4.9 Azote total

Introduire 5 g de gomme arabique 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 en annexe.

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

(Teneur en azote inférieure à 4 g/kg).

La teneur en azote doit être comprise entre
0,25 % et 0,4 % (m/m) pour la gomme d'Acacia senegal et
0,10 et 0,20 % (m/m) pour la gomme d'Acacia seyal.

4.10 Amidon et dextrine

Porter à ébullition 20 ml de solution contenant 2 g de gomme arabique sèche. Refroidir. Ajouter 0,2 ml d'iode 0,05 M. Il ne doit pas se développer de couleur bleue ou brun-rouge.

4.11 Tanin

A 10 ml de solution contenant 1 g de gomme arabique sèche, ajouter 0,1 ml de sulfate fer(III) (R). Il se forme un précipité gélatineux mais ni le précipité ni le liquide surnageant ne doivent être coloré en bleu foncé.

4.12 Pouvoir rotatoire

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

$-26° \leq [\alpha]_D^{20°C} \leq -34°$, pour la gomme d'Acacia senegal

$40° \leq [\alpha]_D^{20°C} \leq 50°$, pour la gomme d'Acacia seyal.

4.13 Salmonelles

Il faut une absence de salmonelles dans 1 g. (méthode de recherche décrite en annexe).

4.14 *Escherichia coli*

Il faut une absence d'*Escherichia coli* dans 1 g. (méthode de recherche décrite en annexe).

4.15 Produits d'hydrolyse

Le mannose, le xylose et l'acide galacturonique sont absents (déterminés par chromatographie).

4.16 Test d'efficacité de la gomme arabique

4.16.1 Principe :

Détermination de la dose de gomme arabique nécessaire pour empêcher la floculation d'une solution colloïdale de hexacyanoferrate(II) de fer(III) en milieu hydro-alcoolique par un sel de calcium.

4.16.2 Produits :

Ac. tartrique cristallisé : PM=150,05
Sulfate de potassium purifié (K_2SO_4) : PM=174,25
Chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2$, $2H_2O$) : PM=143,03
Chlorure de fer(III) cristallisé ($FeCl_3$, $6H_20$) : PM=270,32
Hexacyanoferrate(II) de potassium ($K_4[Fe(CN)_6]$: PM=422,4
Ac. métatartrique
Solution d'hydroxyde de sodium 1M
Ethanol à 95 % vol.
Solution de peroxyde d'hydrogène à 20 volumes

4.16.3 Protocole :

Solution de gomme arabique à 5 g/l (A)

Dissoudre 5 g de gomme arabique dans 100 ml d'eau distillée puis diluer cette solution 1/10 avec de l'eau distillée.

Solution de fer(III) à 2,5 g Fe/l (B)

Peser exactement 1,21 g de chlorure de fer(III) et verser dans une fiole jaugée de 100 ml. Remplir aux 3/4 d'eau distillée et ajouter 0,1 ml de solution de peroxyde d'hydrogène à 20 volumes. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Solution de chlorure de calcium à 27 g/l (C)

Dissoudre 2,7 g exactement pesé de chlorure de calcium dihydraté dans 100 ml d'eau distillée.

Matrice hydro-alcoolique (D)

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

- Acide tartrique : 2,5 g
- K_2SO_4 : 1 g (dissolution complète avant d'ajouter la suite)
- Acide métatartrique : 50 mg
- Ethanol à 95 % vol. : 120 ml
- NaOH 1 M : 10 ml

Ajuster le pH de la matrice à 3,5 par addition de NaOH 1 M (1 à 2 ml). Homogénéiser et compléter à l'eau distillée

Solution d'hexacyanoferrate(II) de potassium à 12,5 g/l (E)

Peser exactement 0,25 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium dans une fiole jaugée de 20 ml. Compléter avec de l'eau distillée.
Cette préparation doit être faite extemporanément.

4.16.4 Test :

Dans le ballon contenant le litre de matrice (D), ajouter exactement 2 ml de solution d'hexacyanoferrate(II) de potassium (E). Boucher et agiter. Ajouter ensuite 1 ml de solution de chlorure de fer(III) (B). Agiter et laisser reposer une demi-heure : solution S (couleur bleue).

Verser dans une série de tubes à essai (capacité > 50 ml) des volumes croissants de solution de gomme à 5 g/l (A) : 0 - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1,0 - 1,25 - 1,5 - 1,75 - 2,0 - 2,5 - 3,0 ml. Ces volumes correspondront à des concentrations finales de gomme de 0 - 25 - 50 - 75 - 100 - 125 - 150 - 175 - 200 - 250 et 300 mg/l.

Répartir ensuite dans chaque tube 50 ml de solution S. Agiter et laisser reposer 5 minutes.

Verser ensuite dans chaque tube 1 ml de solution de chlorure de calcium (C). Boucher et agiter.

Entreposer les tubes à l'abri de la lumière à température ambiante (≅ 25°C).

Lecture au bout de 3 jours :

Le tube témoin présente un dépôt bleu intense avec un surnageant pratiquement incolore. Ce dépôt sera plus ou moins important dans les tubes suivants en fonction de l'efficacité et de la dose de gomme ajoutée.

On notera le tube à partir duquel la solution sera restée de couleur homogène sans aucun dépôt bleu à la base. Ceci correspondra à la dose en mg/l de gomme arabique efficace à utiliser dans les vins.

5. CONSERVATION

La gomme arabique solide a une durée de conservation très longue si elle est stockée à l'abri de l'humidité dans un emballage clos et dans des locaux tempérés. Les solutions ont une durée de vie limitée en raison de la présence de dioxyde de soufre.

KAOLIN

Kaolinum
(Oeno 28/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le kaolin est un silicate d'aluminium hydraté naturel.

Agent de clarification des vins.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté et les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

Poudre fine, blanche ou blanc-jaunâtre, grasse au toucher ; délayée dans l'eau chaude, elle dégage une odeur argileuse ; elle est insoluble dans l'eau et dans les acides dilués.

Le produit de la fusion alcaline du kaolin repris par l'eau donne les réactions des aluminates alcalins et des silicates alcalins.

4. ESSAIS

4.1 Consistance

Mélanger 1 g de kaolin avec 1 ml d'eau ; la pâte obtenue ne devra pas couler.

4.2 Perte d'eau à 700°C

Incinérer à 700°C une prise d'essai voisine de 1 g de kaolin exactement pesée ; la perte de poids ne doit pas être supérieure à 15 p. 100.

4.3 Produits solubles dans les acides dilués

Délayer 1 g de kaolin dans 50 ml de solution 0,2 M d'acide chlorhydrique ; porter à l'ébullition sous reflux pendant 15 minutes, filtrer. Le filtrat, évaporé puis incinéré, ne doit pas laisser de résidu supérieur à 2 p. 100.

4.4 Préparation de la solution pour essais

Faire macérer 5 g de kaolin avec 100 ml de solution d'acide citrique à 5 g par litre à pH 3 (R) pendant 24 heures en agitant de temps en temps. Filtrer.

4.5 Fer soluble

A 10 ml de solution préparée pour essais (4.4), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 5 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p.

100 (R). La coloration obtenue doit être inférieure à celle présentée par un tube témoin préparé avec 5 ml de solution à 0,010 g de fer par litre (R), 5 ml d'acide citrique à 20 g par litre (R), 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 5 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). (Teneur en fer soluble inférieure à 100 mg/kg).

Il est également possible de doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

4.6 Calcium

A 5 ml de la solution préparée pour essais (4.4), ajouter 5 ml d'oxalate d'ammonium en solution à 4 p. 100 (R), 5 gouttes de bleu de bromophénol (R) et de l'hydroxyde d'ammonium concentré (R), en quantité suffisante pour faire virer au bleu l'indicateur. Aucun trouble ne doit se produire.

4.7 Magnésium et aluminium soluble

A 5 ml de la solution préparée pour essais (4.4), ajouter 5 ml de solution de phosphate de sodium à 10 p. 100 (R), 1 goutte de solution de phénolphtaléine à 1 g pour 100 ml d'alcool à 90 % vol. (R) et de l'hydroxyde d'ammonium dilué (R) en quantité suffisante pour obtenir une coloration rose. Aucun précipité ne doit se produire en moins d'une heure.

4.8 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (4.4), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

4.9 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (4.4), effectuer le dosage du mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure 1 mg/kg).

4.10 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (4.4), effectuer le dosage de l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure 3 mg/kg).

4.11 Evaluation des particules grossières

Dans une éprouvette de 250 ml (d'un diamètre d'environ 40 mm) bouchant à l'émeri, mettre en suspension 5 g de kaolin dans 60 ml d'une solution de pyrophosphate tétrasodique (R) à 1 p. 100 et agiter fortement pendant 1 à 2 minutes. Laisser reposer 5 minutes, puis prélever 50 ml de la suspension à l'aide d'un siphon. Ce siphon doit comporter deux branches dont le rapport des longueurs sera 2/5 ; il est constitué par un tube de verre d'un diamètre de 5 mm, dont l'extrémité de la petite branche, convenablement effilée, est placée et maintenue

au-dessous de la surface du liquide de façon à ce que le siphon se désamorce lorsque 50 ml de la suspension auront été prélevés.

Au liquide restant, ajouter 50 ml d'eau ; agiter, laisser reposer 5 minutes, puis prélever à nouveau 50 ml à l'aide du siphon. Répéter l'opération jusqu'à ce que 400 ml d'eau aient été prélevés. Finalement, transvaser dans un creuset taré le résidu de la suspension restant dans l'éprouvette.

Evaporer à sec, dessécher à 100°C pendant 15 minutes et peser. Le résidu ne doit pas être supérieur à 2 p. 100.

4.12 Pouvoir d'adsorption

Dans une éprouvette munie d'un bouchon rodé, agiter pendant 2 minutes 1 g de kaolin avec 10 ml d'une solution de bleu de méthylène 0,01 M, et laisser déposer. Centrifuger la solution et diluer 100 fois. La solution ne doit pas être plus fortement colorée qu'une solution de bleu de méthylène 0,08 mM.

5. CONSERVATION

Le kaolin doit être conservé dans des lieux ventilés et tempérés dans des récipients étanches à l'abri d'éléments volatils qu'il peut adsorber.

LEVURES INACTIVÉES

OIV-OENO 459-2013
OIV-OENO 740-2024

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les levures inactivées sont utilisées en tant que nutriments pour les levures au début et au cours de la fermentation alcoolique et également pour favoriser la réhydratation des levures sèches actives. Elles peuvent aider à réduire le niveau en Ochratoxine A, aux étapes des opérations d'élevage et de clarification des vins. [26]
Elles sont issues de biomasses de *Saccharomyces spp.* ou *non-Saccharomyces* , inactivées par la chaleur et/ou par une modification du pH. Elles peuvent avoir subi un début d'autolyse naturelle sous l'action des enzymes endogènes. Les techniques de production sont celles utilisées conventionnellement pour les biomasses de levures. Il n'y a aucun ajout d'antibiotique dans le procédé ni de composés autres que ceux nécessaires à la croissance de la levure.
Lorsque les levures inactivées proviennent de levures génétiquement modifiées, celles-ci doivent avoir été soumises à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

2. ETIQUETAGE

Doivent figurer sur l'étiquette:

- Le nom du genre et de l'espèce des levures iinactivées
- La teneur en azote organique
- Les additifs éventuels
- Le mode d'emploi
- Le numéro du lot ainsi que la date limite d'utilisation et les conditions de conservation dans des conditions définies de température, d'humidité et d'aération.
- L'indication que les levures inactivées proviennent de levures obtenues par modifications génétiques ainsi que le caractère modifié si cela est le cas.

3. CARACTÈRES

Elles se présentent le plus souvent sous forme de granules, poudre ou flocons de couleur jaune claire à ocre jaune avec une odeur caractéristique de levure

[26] Code des bonnes pratiques vitivinicoles en vue de limiter au maximum la présence d'OTA dans les produits issus de la vigne.

Les levures inactivées sont en partie solubles dans l'eau, la partie insoluble étant supérieure ou égale à 60% m/m de la matière sèche.

1. LIMITES ET MÉTHODES D'ESSAIS

4.1 Teneur en azote

4.1.1 La teneur en azote total, exprimée en élément N, est inférieure à 10% de la matière sèche, selon la méthode d'analyse décrite au Chapitre II du Codex Œnologique International.

4.1.2 La teneur en azote ammoniacal, exprimée en élément N, doit être inférieure à 0,5% de la matière sèche, elle est déterminée selon la méthode d'analyse suivante.
Placer 1 g de matière sèche dans 100 ml de KCL 0,5 M,
agiter pendant 20 à 30 mn,
introduire les 100 ml dans l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau décrit au Chapitre II du Codex Œnologique International pour le dosage de l'azote total, 50 ml d'hydroxyde de sodium à 30% (R),
distiller en recueillant 250 ml dans une fiole conique contenant 5 ml d'acide borique à 4 p. 100 (R), 10 ml d'eau et 2 à 3 gouttes d'indicateur mixte au rouge de méthyle et bleu de méthylène (R),
titrer le distillat par l'acide chlorhydrique 0,1 M jusqu'au virage au violet rose de l'indicateur.

1 ml de solution d'acide chlorhydrique correspond à 1,4 mg d'azote N.
Soit *n* le nombre de ml versé :
100 g de levures sèches inactivées contiennent 0,14 *n* g d'azote ammoniacal exprimé en élément N.

4.1.3 La teneur en azote organique est obtenue par la différence entre la teneur en azote total et la teneur en azote ammoniacal.
4.1.4 La teneur en acides aminés libres et solubles et en petits peptides doit être inférieure à 10% de matière sèche en équivalent glycine, selon la méthode DNFB décrite en annexe, soit 1,9 % de la matière sèche exprimée en élément N

4.2 - Humidité

Elle est mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant (environ 3 heures)
La teneur maximale doit être inférieure à 7 %.

4.3 - Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.4 - Mercure
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.5 - Arsenic
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.6 - Cadmium
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.7 - Levures revivifiables
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
Le nombre doit être inférieur ou égal à 10^2 UFC/g

4.8 - Moisissures
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
Le nombre doit être inférieur à 10^3 UFC/g de matière sèche.

4.9 - Bactéries lactiques
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
Le nombre doit être inférieur à 10^3 UFC/g de matière sèche.

4.10 - Bactéries acétiques
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
Le nombre doit être inférieur à 10^3UFC/g de matière sèche.

4.11 - Salmonelles
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g de matière sèche.

4.12 - Escherichia coli
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g de matière sèche.

4.13 - Staphylocoques
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g de matière sèche

4.14 - Coliformes
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
Le nombre doit être inférieur à 10^2 UFC/g de matière sèche.

5. ADDITIFS
Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION
Les levures inactivées doivent toujours être conservées à l'abri de l'air dans des sachets scellés. Stocker dans un endroit frais et sec.
Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant.

Annexe 1

Méthode au Dinitrofluorobenzène

1. Introduction
Cette méthode permet de doser rapidement l'azote aminé dans une solution biologique par rapport à une gamme étalon réalisée avec une solution de glycine.

2. Domaine d'application
Produits œnologiques d'origine végétale ou animale

3. Définition
Le Dinitrofluorobenzène ou DNFB réagit avec les fonctions NH_2 libres contenues dans les acides aminés pour donner un composé de couleur jaune vif dosé par colorimétrie à 420 nm. La réaction s'effectue à un pH > 9,3.

4. Réactifs et produits
Réactifs :
- Borax ou Tétraborate de sodium,
- Dinitrofluorobenzène,
- Acide chlorhydrique 10 M,
- Glycine.

5. Appareillage
- tubes à hémolyse,
- micropipettes,
- Spectrophotomètre pour mesures dans le visible,
- Bain d'eau à 60 °C.

6. Echantillonnage
- Préparer une solution de tétraborate de sodium à 5% dans de l'eau pure,
- Préparer une solution de DNFB : introduire 130 µl de DNFB dans 10 ml d'éthanol à 95 % vol.,
- Préparer une solution d'acide chlorhydrique 2M,
- Réaliser une gamme étalon à partir d'une solution mère de glycine à 2 g/l (M=75,07 g) par ex 0,50 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l,
- Préparer une solution à 2 g/l du produit à doser.

7. Mode opératoire
- Dans un tube à hémolyse introduire :
  - 380 µl de Borax à 5%,
  - 20 µl de l'échantillon à doser,
  - 20 µl de solution au DNFB,
  - procéder à l'identique pour la gamme de glycine,

- Agiter et placer au bain d'eau à 60 °C pendant 30 min,
- Ajouter 3 ml de HCl 2M,
- Agiter et lire l'absorbance spécifique à 420 nm pour l'échantillon,
- Réaliser une droite étalon avec la gamme de Glycine.

8. Résultats

Reporter la valeur de l'absorbance à 420 nm de l'échantillon sur la droite étalon. Les résultats sont exprimés en g/l de Glycine.

LEVURES INACTIVÉES À TENEUR GARANTIE EN GLUTATHION

OIV-OENO 603-2018

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Ces levures sèches inactivées (LSI) à teneur garantie en glutathion sont caractérisées par une teneur en glutathion réduit supérieure à celle contenue dans les levures inactivées standard,

Elles sont utilisées pour limiter les phénomènes d'oxydation dans les moûts et les vins. La présence de glutathion réduit (GSH) peut être accompagnée de celles de ses précurseurs, la cystéine et, notamment, la gamma-glutamyl-cystéine.

Comme les levures sèches inactivées classiques, elles apportent également des nutriments pour les levures au début et au cours de la fermentation alcoolique. Elles peuvent aider à réduire le niveau en Ochratoxine A, aux étapes des opérations d'élevage et de clarification des vins[27] (résolution OENO 459-2013).

Elles sont issues de biomasses de *Saccharomyces spp et/ou de non Saccharomyces* dont la production est dirigée de façon à augmenter la production naturelle de glutathion sous forme réduite (GSH). Elles sont donc issues de cultures pures sans aucun ajout ultérieur de glutathion ou de cystéine et de gamma-glutamyl-cystéine dans le produit final, ce qui est attesté par un rapport gamma-glutamyl-cystéine/GSH supérieur à 20 %.

Elles sont inactivées par la chaleur et/ou par une modification du pH. Elles peuvent avoir subi un début d'autolyse naturelle sous l'action des enzymes endogènes. Il n'y a aucun ajout d'antibiotique dans le procédé ni de composés autres que ceux nécessaires à la croissance de la levure.

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

2. ÉTIQUETAGE

[27] Code des bonnes pratiques vitivinicoles en vue de limiter au maximum la présence d'OTA dans les produits issus de la vigne

Doivent figurer sur l'étiquette:

- Le nom du genre et de l'espèce des levures inactivées à teneur

garantie en glutathion

- La teneur minimale, exprimée en mg/g de levures sèches inactivées (LSI), en glutathion réduit
- La teneur maximale, exprimée en mg/g de levures sèches inactivées (LSI), en cystéine
- La teneur maximale, exprimée en mg/g de levures sèches inactivées (LSI), en gamma-glutamyl-cystéine.
- La teneur en azote organique
- Les additifs éventuels
- Le mode d'emploi
- Le numéro du lot ainsi que la date limite d'utilisation et les conditions de conservation, notamment de température, d'humidité et d'aération.
- L'indication que les levures inactivées proviennent de levures obtenues par modifications génétiques ainsi que le caractère modifié, si cela est le cas.

•

3. CARACTÈRES

Elles se présentent le plus souvent sous forme de granules, poudre ou flocons de couleur jaune clair à ocre jaune avec une odeur caractéristique de levure. Les levures inactivées à teneur garantie en GSH sont en partie solubles dans l'eau, la partie insoluble étant supérieure ou égale à 60% m/m de la matière sèche.

4. LIMITES ET MÉTHODES D'ESSAIS

4.1 - Teneur en glutathion oxydé (GSSG)

Les teneurs en glutathion sous forme oxydée en disulfure de glutathion (GSSG), la seule identifiée en l'état de nos connaissances, sont mesurées par la méthode CLHP décrite en annexe 1.

4.1.1 Préparation de la solution pour essais

Peser précisément 2 g de levures sèches inactivées et placer les dans un tube à centrifuger de 20 ml, ajouter 1 ml de billes de verre de 425 à 600 microns et 4 ml de solution tampon phosphate pH 7,5.

Passer au vortex pendant 20 min à 4°C puis centrifuger à 4°C pendant 20 min à 12000 g minimum.

Le surnageant représente la solution pour essais à garder à 4°C à l'abri

de la lumière pendant 4h maximum avant le dosage.

Le rapport entre glutathion réduit et le glutathion oxydé devrait être supérieur à 3.

4.2 - Teneurs en glutathion réduit (GSH), en cystéine et gamma- glutamyl-cystéine

Les teneurs en glutathion réduit, en cystéine et gamma- glutamyl-cystéine sont mesurées par la méthode CLHP après dérivatisation décrite en annexe 4

- La teneur en glutathion réduit doit être supérieur à 1 %, soit 10 mg/g de LSI
- la teneur en cystéine endogène doit être inférieure à 0,3 % maximum, soit 3 mg/g de LSI
- la teneur en gamma-glutamyl-cystéine doit être inférieure à 1 %, soit 10 mg/g de LSI

4.3 - Teneur en azote

4.3.1 La teneur en azote total, exprimée en élément N, est inférieure à

10 % de la matière sèche, selon la méthode d'analyse décrite au Chapitre II du *Codex Œnologique International*, soit *Nt*

4.3.2 La teneur en azote ammoniacal, exprimée en élément N, doit être inférieure à 0,5% de la matière sèche, elle est déterminée selon la méthode d'analyse décrite en **annexe 2**, soit *Na*

4.3.3 La teneur en azote organique est obtenue par la différence entre

---

la teneur en azote total et la teneur en azote ammoniacal. : Azote organique = *NT-Na*

4.3.4 La teneur en acides aminés libres et solubles et en petits peptides doit être inférieure à 10% de matière sèche en équivalent glycine, selon la méthode DNFB décrite en annexe 3, soit 1,9 % de la matière sèche exprimée en élément N

4.4 - Humidité

Elle est mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant (environ 3 heures). La teneur maximale doit être inférieure à 7 %.

4.5 - Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.6 - Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.7 - Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.8 - Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.9 - Levures revivifiables

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du

Codex Œnologique International. Le nombre doit être inférieur ou égal à 102 UFC/g de matière sèche.

4.10 - Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. Le nombre doit être inférieur à 103 UFC/g de matière sèche.

4.11 - Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. Le nombre doit être inférieur à 103 UFC/g de matière sèche.

4.12 - Bactéries acétiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. Le nombre doit être inférieur à 103UFC/g de matière sèche.

4.13 - Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International* L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g de matière sèche.

4.14 - Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g de matière sèche.

4.15 - Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du

Codex Œnologique International.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g de matière sèche.

4.16 - Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International. Le nombre doit être inférieur à 102 UFC/g de matière sèche.

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Ne pas conserver en conditionnement ouvert. Les levures inactivées à teneur garantie en glutathion doivent toujours être conservées à l'abri de l'air dans des sachets scellés. Stocker dans un endroit frais et sec. Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant. Un stockage dans des conditions non appropriées peut réduire la teneur du produit en glutathion réduit (GSH).

Annexe 1

Dosage du glutathion réduit et oxydé CLHP

Ce dosage est effectué selon la méthode de détermination du glutathion dans des préparations pharmaceutiques selon Soliman et al. (2014).

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage du glutathion réduit et du glutathion oxydé ou disulfure de glutathion (GSSG) dans une gamme de concentration de 0 à 100 mg/L de préparation pour l'analyse.

2. Principe

La méthode utilisée procède par chromatographie liquide à haute performance selon le principe de phases inverses (colonne C18) avec une détection par spectrophotométrie utilisant un appareil à barrettes de diodes entre 200 et 400 nm.

3. Produits et réactifs

3.1 Liste des produits

3.1.1 Glutathion (GSH, > 98 %),

3.1.2 Méthanol (pureté pour CLHP)

3.1.3 Acide formique (pureté > 98 %)

3.1.4 Eau ultrapure de résistivité >18 MΩ.cm à une température de 25 °C

3.2 Phase mobile

La phase mobile est constituée d'eau ultrapure (3.1.4) contenant 0,1 % du mélange acide formique (3.1.3) et de méthanol (3.1.2) dans les proportions de 90 : 10, v/v.

4. Matériels

4.1 Appareil de chromatographie en phase liquide haute performance.

4.2 Spectrophotomètre à barrettes de diodes

4.3 Appareil d'acquisition des données

4.4 Colonne de type octadécyle de dimensions 150 mm x 2 mm avec un diamètre de phase de 3 µm (à titre d'exemple).

4.5 Injecteur à boucle de 230 µL

4.6 Système de dégazage des solvants (ultrasons)

4.7 Système de filtration des échantillons sur membrane de diamètre de pores de 0,45 µm

5. Préparation des échantillons

5.1 L'échantillon contenant le glutathion à doser est préparé par dilution de la solution pour essais (point 4.1.1 de la monographie) dans la phase mobile (3.2) afin d'obtenir une concentration finale de l'ordre de 20 mg/L

5.2 Les échantillons sont filtrés sur membrane (4.7) avant injection.

6. Mode opératoire

L'analyse s'effectue à la température ambiante, selon le mode isocratique avec un débit de phase mobile de 0,5 mL/min.

La détection s'effectue selon le mode "scan" de 200 à 400 nm.

7. Résultats

Dans ces conditions analytiques, le glutathion réduit (GSH) est bien séparé du glutathion oxydé (GSSG). Cette méthode permet par conséquent de doser les deux formes du glutathion

Dans ces conditions analytiques, le temps de rétention du glutathion est de 7,5 min, celui du glutathion oxydé est de 9,5 min.

8. Caractéristiques de la méthode

Chaque concentration est calculée à partir de la moyenne de trois déterminations obtenues en utilisant la droite de régression de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en mg/L.

La régression linéaire et le coefficient de corrélation sont calculés selon la méthode des moindres carrés.

Linéarité

La gamme de linéarité est de 0 - 100 mg/L, le coefficient de corrélation R = 0,9998.

Précision

La précision de la méthode a été évaluée à partir de 3 analyses de glutathion à 1,0, 50,0, et 100,0 mg/L d'une part en une seule journée et d'autre part en 3 jours différents.

Tableau 1 Caractéristiques de la méthode de dosage du glutathion réduit à partir des taux de récupération.

	Précision journalière		Précision sur 3 jours	
Concentration GSH mg/L	% récupération, SD	CV %	% récupération, SD	CV %
1	99,88 ± 0,68	0,68	99,76 ±1,89	1,89
50	100,04 ± 0,39	0,39	100,09 ± 0,73	0,73
100	99,93 ± 0,57	0,57	99,85 ± 0,86	0,86

Domaine d'application

Selon les déterminations effectuées, la méthode est applicable pour des concentrations de 0 à 100 mg/L

Les limites de détection et de quantification du glutathion établies selon les lignes directrices de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH), (3,3 et 10 fois la déviation standard du blanc, pour 7 analyses, sur la pente de la droite de calibration, sont LD = 20 µg/L et LQ = 68 µg/L.

9. Bibliographie

Soliman R.M, Hadad G.M, Abdel Salam R.A.,Mesbah M.K., (2014) Quantitative determination of glutathione in presence of its degradant in a phamaceutical preparation using HPLC-DAD and identification by LC- ESI-MS. J. Liquid Chromatography and related technologies 37:548-559.

Annexe 2

Dosage de l'azote ammoniacal

1. Réactifs

1.1 Chlorure de potassium (KCl 0,5 M)

Dissoudre 18,64 g de KCl dans 500 mL d'eau déminéralisée pure

1.2 Hydroxyde de sodium à 30 %

Placer 30 g d'hydroxyde de sodium dans une fiole de 100 mL ajouter 70 mL d'eau déminéralisée pure, dissoudre par agitation, compléter à 100 mL,

1.3 Acide borique à 4 % (R)

Voir R partie II du codex œnologique international,

1.4 Acide chlorhydrique 0,1 M pour titration (solution prête à l'emploi du

commerce),

1.5 Indicateur mixte au rouge de méthyle et bleu de méthylène voir R

partie II du codex œnologique international,

2. Matériel

2.1 Verrerie de laboratoire,

2.2 Appareil à entraînement par la vapeur d'eau décrit au Chapitre II du

Codex Œnologique International pour le dosage de l'azote total

3. Dosage

3.1 Placer 1 g de matière sèche de levures inactivées dans 100 ml de KCL 0,5 M (1.1), agiter pendant 20 à 30 min,

3.2 Introduire les 100 ml dans l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau (2.2.), 50 ml d'hydroxyde de sodium à 30 % (R),

3.3 Distiller en recueillant 250 ml dans une fiole conique contenant 5 ml d'acide borique à 4 % (1.3), 10 ml d'eau et 2 à 3 gouttes d'indicateur mixte au rouge de méthyle et bleu de méthylène (1.5),

titrer le distillat par l'acide chlorhydrique 0,1 M (1.4) jusqu'au virage au violet rose de l'indicateur.

1 ml de solution d'acide chlorhydrique correspond à 1,4 mg d'azote N.

Soit *n* le nombre de ml versé :

100 g de levures sèches inactivées contiennent 0,14 *n* g d'azote

ammoniacal exprimé en élément N. soit *Na*

Annexe 3

Méthode de l'azote aminé

1. Introduction

Cette méthode permet de doser rapidement l'azote aminé dans une solution biologique par rapport à une gamme étalon réalisée avec une solution de glycine.

2. Domaine d'application

Produits œnologiques d'origine végétale ou animale

3. Définition

Le dinitrofluorobenzène ou DNFB réagit avec les fonctions NH2 libres contenues dans les acides aminés pour donner un composé de couleur jaune vif dosé par colorimétrie à 420 nm. La réaction s'effectue à un pH

> 9,3.

4. Réactifs et produits

Réactifs :

4.1 Borax ou Tétraborate de sodium,

4.2 Dinitrofluorobenzène, attention aux dangers lors de la manipulation du DNFB

4.3 Acide chlorhydrique 10 M,

4.4 Glycine, pureté ≥ 98%,

4.5 Éthanol 95 % vol.

5. Appareillage

5.1 Tubes à hémolyse,

5.2 Micropipettes,

5.3 Spectrophotomètre pour mesures dans le visible,

5.4 Bain d'eau à 60 °C.

6. Echantillonnage

6.1 Préparer une solution de tétraborate de sodium à 5% dans de

l'eau pure,

6.2 Préparer une solution de DNFB : introduire 130 µl de DNFB dans 10 ml d'éthanol à 95 % vol.,

6.3 Préparer une solution d'acide chlorhydrique 2M,

6.4 Réaliser une gamme étalon à partir d'une solution mère de glycine à 2 g/L (M=75,07 g) par ex 0,50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L,

6.5 Préparer une suspension à 2 g/L du produit à doser, centrifuger après 30 min et récupérer le surnageant.

7. Mode opératoire

- Dans un tube à hémolyse introduire : 380 µl de Borax à 5% (6.1),

20 µl de l'échantillon à doser (6.5),

20 µl de solution au DNFB (6.2),

- procéder à l'identique pour la gamme de glycine,
  - Agiter et placer au bain d'eau à 60 °C pendant 30 min (5.4),
  - Ajouter 3 ml de HCl 2M (6.3),
  - Agiteret lire l'absorbance spécifique à 420 nm pour l'échantillon (5.3),
  - Réaliser une droite étalon avec la gamme de Glycine (6.4).

8. Résultats

Reporter la valeur de l'absorbance à 420 nm de l'échantillon sur la

droite étalon. Les résultats sont exprimés en g de Glycine /L.

Annexe 4

Dosage du glutathion réduit, de la cystéine et gamma-glutamyl-cystéine par CLHP après dérivatisation

Préambule

Le principe est de doser par CLHP/CLUP-UV sur colonne en phase inverse des acides aminés et des peptides thiolés après dérivatisation de cette fonction. Cette méthode est adaptée à des matrices complexes du type levures et dérivés de levures.

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage du glutathion réduit (GSH), de la cystéine (Cys) et de la gamma-glutamyl-cystéine (GluCys) dans une gamme de concentration allant de :

- de 2 à 24 mg/L pour les composés GSH et GluCys,
- de 0,5 à 6 mg/L pour la Cys.

2. Principe

La méthode utilisée procède par chromatographie liquide à haute performance selon le principe de phase inverse (colonne C18) avec une détection par spectrophotométrie à 320nm.

3. Produits et réactifs

3.1 Produits

3.1.1 GSH : Glutathion, n° CAS 70-18-8 (pureté > 98

%)

3.1.2 Cys.HCl.H_2O : Chlorhydrate de L-Cystéine

monohydratée, n° CAS 7048-04-6 (pureté > 98 %)

3.1.3 GluCys : γ-L-Glutamyl-L-cystéine, n° CAS 636-58-8 (pureté > 80 %)

3.1.4 Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4,H_2O), pur

3.1.5 Acétate de sodium anhydre, pur

3.1.6 Acide acétique 17,4 M, pur

3.1.7 Méthanol (pureté pour CLHP)

3.1.8 Acide phosphorique concentré (pureté > 98 %)

3.1.9 Eau ultrapure de résistivité >18 M □ .cm à une température de 25 °C.

3.1.10 Acétonitrile, pure

3.1.11 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DNTP), n°CAS 2127-10-8 (pureté > 96%)

3.1.12 Solution concentrée d'acide trichloracétique (25-30 %)

3.2 Tampon acétate (utilisé pour la dérivatisation)

- Peser 8.1g d'acétate de sodium (3.1.5), les dissoudre dans environ 100 mL d'eau ultra pure (3.1.9).

- Ajuster le pH à 6,3 avec de l'acide acétique (3.1.6) (environ 100 à 200 µl).

- Compléter à 1L avec de l'eau ultra pure (3.1.9).

3.3 Réactif 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DNTP)
(à préparer extemporanément)

- Peser 30 mg de DNTP (3.1.11), les dissoudre dans 10 mL d'acétonitrile (3.1.10).

3.4 Acide trichloracétique à 5,7 %

- Dissoudre 19 g d'acide trichloracétique à 30 % (3.1.12) dans 100 mL d'eau ultra pure

(3.1.9).

3.5 Phase mobile

- **Eluant A :** Peser 3,4g de NaH_2PO_4,H_2O (3.1.4), les dissoudre dans 898g d'eau ultra pure (3.1.9), ajouter 79g de méthanol (3.1.7), ajuster le pH de 4,45 à 2,5 par addition d'acide phosphorique concentré (3.1.8) (environ 0,8 - 1ml).
- **Eluant B :** Méthanol (3.1.7).

4. Matériels

4.1 Appareil de chromatographie en phase liquide haute performance

4.2 Spectrophotomètre avec détection à 320 nm

4.3 Appareil d'acquisition des données

4.4 Colonne de type octadécyle de dimensions 250 mm x 4.6 mm avec un diamètre de phase de 5 µm (à titre d'exemple, RP Supelcosil ABZ+Plus ; Water XTerra RP18 ou équivalent)

4.5 Injecteur à boucle

4.6 Système de dégazage des solvants (ultrasons)

4.7 Système de filtration des échantillons sur membrane de diamètre de pore de 0,45 µm

4.8 Agitateur magnétique

4.9 Centrifugeuse

4.10 pH mètre

4.11 Verrerie courante de laboratoire

5. Préparation des échantillons

5.1 Préparation des étalons

5.1.1 Solution de GSH à ~400 mg/L

Dans une fiole de 200 ml, dissoudre ~80 mg de GSH (3.1.1) pesés **exactement,** et compléter à 200 ml par de l'eau ultra pure (3.1.9).

5.1.2 Solution de GluCys à ~400 mg/L

Dans une fiole de 50 ml, dissoudre ~20 mg de GluCys (3.1.3) pesés **exactement**, et compléter à 50 ml par de l'eau ultra pure (3.1.9).

5.1.3 Solution de Cys.HCl.H_2O à ~100 mg/L

Dans une fiole de 100 ml, dissoudre ~130 mg de Cys.HCl.H_2O (3.1.2) pesés **exactement**, et compléter à 100 ml par de d'eau ultra pure

(3.1.9), diluer ensuite au 1/10e avec de l'eau ultra pure (3.1.9).

5.2 Préparation des échantillons

La prise d'essai (PE) de l'échantillon doit être adaptée pour que la concentration soit comprise dans la gamme d'étalonnage, c'est-à-dire entre 2 et 24 mg/L de GSH. Pour une levure sèche inactivée (LSI) à teneur garantie en GSH, effectuer au préalable une extraction selon le protocole suivant :

- Peser ~1g de LSI **exactement**, ajouter 17,5mL d'acide trichloracétique à 5,7 % (3.4).
- Agiter pendant 20 min à température ambiante (4.8).
- Ajuster à 50 mL (=V) avec de l'eau ultra pure (3.1.9).
- Centrifuger 10 min à 5500 tr/min. (4.9).

6. Dérivatisation

- A effectuer dans des tubes à essai à partir des préparations 5.1 selon le tableau suivant.
- Agiter les tubes par retournement.

La réaction est complète en 5 minutes. Les différentes solutions sont analysées par CLHP après filtration (4.7).

							En double
		Standard 1 GSH et GluCys : 2mg/L Cys 0.5 mg/L	**Standard 2** GSH et GluCys : 4mg/L Cys 1 mg/L	**Standard 3** GSH et GluCys : 8mg/L Cys 2 mg/L	**Standard 4** GSH et GluCys : 16mg/L Cys 4 mg/L	**Standard 5** GSH et GluCys : 24 mg/L Cys 12 mg/L	**Essai**
Tampon acétate (ml)		8.85	8.7	8.4	7.8	7.2	8
Solution étalon (µl)	**GSH (400**	50	100	200	400	600	
	Cys (100	50	100	200	400	600	
	GluCys (400	50	100	200	400	600	
Echantillon (µl)							1000
DNTP (µl)		1000					

Attention : Penser à adapter la prise d'essai en fonction de la coloration. Vérifier que les essais soient bien dans la gamme.

7. Conditions chromatographiques

Température de la colonne : 30 °C

Température échantillon : 5 °C

Débit phase mobile : 1 ml/min

Volume d'injection : 5 µl

Pression : 140-175·10^3 hPa (environ 2000-2500 psi)

Détection : 320 nm

Durée de l'analyse : 34 min

Délai d'équilibration en fin d'analyse : 10 min

Rinçage : eau

Stockage : eau / Méthanol 80:20 v/v

Temps après injection (min)	% éluant A	% éluant B
	100	0
1	100	0
23	40	60
28	0	100
32	0	100
34	100	0

8. Droites d'étalonnage

Pour chaque analyte, établir les droites de calibration C (mg/L)= f[A] en tenant compte :

- Des concentrations en mg/L pour la Cys, le GSH et la GluCys,
- Du facteur de dilution,
- Des aires obtenues.

Attention : Pour la Cys, **tenir compte de l'HCl** : PE (g/L) * MCys pure (121,16 g/mol) / MCys,HCl.H_2O (175,63 g/mol)

Calculs des concentrations :

- Ramenées à la matière sèche (MS) :

$$\text{g/100g MS} = \frac{Aire}{pente} \times \frac{V\,(=50ml)}{PE\,(g)} \times \frac{1}{10 \times MS}$$

- Ou sur produit tel que : $\text{g/100g} = \frac{Aire}{pente} \times \frac{V\,(=50ml)}{PE\,(g)} \times \frac{1}{1000}$

9. Bibliographie

- Rahman et al ; *Nature Protocols* 1, 3159 - 3165 (2007)

- Katrusiac et al., Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl–glycine, homocysteine and glutathione in plasma

and cell extracts. *Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,* 758-2; (2001): 207-212

- Raju N.Appala et al., A Simple HPLC-UV Method for the Determination of Glutathione in PC-

12 Cells, *Scientifica,* Volume 2016 (2016).

L-TARTRIQUE (ACIDE)
L-2,3-dihydroxybutanedioïque
Acide tartrique droit
Acidum tartaricum
COOH - CHOH - CHOH - COOH
$C_4H_6O_6$ = 150,1
N° SIN : 334
(Oeno 49/2000 modifiée par Oeno 4/2007, OIV-OENO 691-2025)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Acide d'origine naturelle extrait des produits de la vigne.

Il est utilisé pour l'acidification des moûts et des vins dans les conditions fixées par la réglementation.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner de manière particulièrement claire qu'il s'agit de l'acide L-tartrique quelquefois noté L(+)tartrique car son pouvoir rotatoire est positif, le taux de pureté (supérieur à 99,5 %) et les conditions de conservation.

3. CARACTERES

Cristaux incolores, transparents, très résistants, dépourvus d'eau de cristallisation, de saveur franchement acide.

F = 170°C.

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C	très soluble
Alcool à 95 % vol.	379 g/l
Glycérol	soluble
Ether éthylique	très peu soluble

5. POUVOIR ROTATOIRE

En solution aqueuse à 20 g pour 100 ml

$[\alpha]^{20°C}$ est compris entre +11,5° et +13,5°.

D

Le pouvoir rotatoire spécifique varie considérablement avec la température et aussi le pH.

6. CARACTERES D'IDENTITE

6.1 Vérifier la totale solubilité dans l'eau ; la solution à 1 p. 100 présente une réaction acide vis-à-vis du méthylorange (R).

6.2 Dans un tube à essais, placer 2 ml d'acide sulfurique concentré (R), 2 gouttes de réactif sulforésorcinique (R) et un très petit cristal d'acide tartrique (1 à 5 mg); chauffer à 150°C. Une intense coloration violette se développe.

6.3 A 5 ml de solution à 10 p. 100 (m/v), ajouter 2 ml de solution d'acétate de potassium à 5 p. 100 (R). Un précipité cristallisé doit se former immédiatement.

6.4 Dans un tube à essais, placer 5 ml de chloroforme ou de dichlorométhane ; ajouter 100 à 200 mg d'acide tartrique. Agiter. Les cristaux doivent se rassembler au fond du tube. Dans ces conditions, l'acide citrique se rassemble à la surface de liquide.

6.5 *Détermination de la source : La méthode décrite en annexe 1 peut être utilisée pour déterminer l'origine de l'acide tartrique : produit à partir de raisin ou d'origine synthétique.*

7. ESSAIS

7.1 Matières étrangères

L'acide tartrique doit être soluble sans résidu dans son poids d'eau et dans 4 fois son poids d'alcool à 95 % vol.

7.2 Cendres sulfuriques

Déterminer comme il est indiqué en annexe, le taux de cendres sulfuriques de l'acide tartrique, sur une prise d'essai exactement pesée voisine de 2 g. Ce taux de cendres sulfuriques ne devra pas être supérieur à 1 g/kg.

7.3 Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 10 g d'acide tartrique dans une quantité suffisante d'eau pour avoir 100 ml de solution.

7.4 Chlorures

A 0,5 ml de solution préparée pour essais (7.3), ajouter 14,5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Après 15 minutes de repos à l'obscurité, on ne doit pas observer de trouble, ou celui-ci doit être inférieur à celui du témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en chlorures, exprimée en acide chlorhydrique, inférieure à 1 g/kg).

7.5 Sulfates

A 1 ml de solution préparée pour essais (7.3), ajouter 18 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R) et 2 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R). Après 15 minutes de repos, on ne doit pas observer de trouble, ou celui-ci doit être inférieur à celui présenté par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en sulfates, exprimée en acide sulfurique, inférieure à 1 g/kg).

7.6 Acide citrique

A 5 ml de solution préparée pour essais (7.3), ajouter 5 ml d'eau, 2 ml de solution de sulfate de mercure(II) (R), porter à l'ébullition et ajouter quelques gouttes de la solution de permanganate de potassium à 2 p. 100 (R). Aucun précipité blanc ne doit se former.

7.7 Acide oxalique et baryum (test)

Neutraliser par addition d'hydroxyde d'ammonium 5 ml de solution préparée pour essais (7.3), ajouter 2 gouttes d'acide acétique (R) et 5 ml de solution saturée de sulfate de calcium (R). La solution doit rester limpide. (Une opalescence pourrait apparaître par précipitation d'oxalate de calcium ou de sulfate de baryum).

7.8 Acide oxalique (dosage)

Si le test réalisé en 7.7 est positif, effectuer le dosage de l'acide oxalique.

Sur la solution préparée pour essais (6.3), doser l'acide oxalique selon la méthode décrite en annexe. (Teneur, exprimée en acide oxalique, inférieure à 100 mg/kg après dessiccation).

7.9 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (7.3), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge que l'on obtient doit être inférieure à celle

obtenue en utilisant 1 ml de solution de sel de fer(III) à 0,010 g de fer par litre, 9 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur en fer inférieure à 10 mg/kg).
Il est également possible de doser le fer par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au Recueil.

7.10 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (7.3), appliquer la méthode figurant au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 2 mg/kg).

7.11 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (7.3), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

7.12 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (7.3), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

8.DOSAGE

Dissoudre dans 10 ml d'eau une prise d'essai **p** exactement pesée voisine de 1 g d'acide L-tartrique. Titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium 1 M (R) en présence de phénolphtaléine (R). Soit **n** le nombre de millilitres employés.

1 ml de solution d'hydroxyde de sodium 1 M correspond à 0,075 g d'acide L-tartrique.

Teneur pour cent en acide L-tartrique du produit essayé:

$$7{,}5\ \mathbf{n}$$

Le produit oenologique doit contenir au minimum 99,5 p. 100 d'acide L-tartrique, rapporté au produit desséché.

9. CONSERVATION

L'acide L-tartrique doit être conservé dans des récipients hermétiquement clos.

Annexe I

DÉTERMINATION DES RAPPORTS ISOTOPIQUES $^{13}C/^{12}C$ ET $^{18}O/^{16}O$ DE L'ACIDE L(+)TARTRIQUE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE DES RAPPORTS ISOTOPIQUES

INTRODUCTION

L'acide L(+)tartrique est un composé cristallin naturel présent dans de nombreux fruits, parmi lesquels le raisin. Dans le moût de raisin, sa concentration varie entre 0,2 g/L et 6 g/L.

Dans la littérature, il est démontré que les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ et $^{18}O/^{16}O$ de l'acide tartrique peuvent permettre de différencier l'acide tartrique issu du raisin de l'acide tartrique de synthèse.

La méthode décrite ci-après peut être utilisée pour déterminer l'origine de l'acide tartrique : produit à partir de raisin ou d'origine synthétique.

ATTENTION : Certains réactifs utilisés au cours de ce mode opératoire sont dangereux : veillez à prendre des précautions particulières lors de leur utilisation. L'opérateur est prié de respecter les instructions indiquées sur l'étiquette du contenant du produit et de consulter les fiches de données de sécurité afin de prendre connaissance des informations spécifiques relatives à la dangerosité des réactifs utilisés et à la manière de les mettre au rebut.

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Le but de la méthode est d'analyser les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ et $^{18}O/^{16}O$ de l'acide L(+)tartrique d'une pureté non inférieure à 95 % à l'aide d'une technique de spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI).

2. TERMES ET DEFINITIONS

Aux fins du présent document, les définitions suivantes s'appliquent :

- $^{13}C/^{12}C$: rapport des isotopes carbone 13 et carbone 12 pour un échantillon donné.
- $\delta^{13}C$: rapport entre les isotopes carbone 13 (^{13}C) et carbone 12 (^{12}C), exprimé en delta pour mille (‰).
- $^{18}O/^{16}O$: rapport des isotopes oxygène 18 et oxygène 16 pour un échantillon donné.
- $\delta^{18}O$: rapport entre les isotopes oxygène 18 et oxygène 16, exprimé en delta pour mille (‰).

- V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) : étalon de référence international pour le calcul du $\delta^{13}C$.
- V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water) : étalon de référence international pour le calcul du $\delta^{18}O$.

3. PRINCIPE

L'acide L(+)tartrique d'une pureté non inférieure à 95 % est analysé. Les rapports isotopiques stables de C et de O sont analysés au moyen d'un spectromètre de masse des rapports isotopiques (SMRI) connecté à un analyseur élémentaire (AE) et à un pyrolyseur (P) à partir des courants ioniques :

- m/z = 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O$) et m/z = 45 ($^{13}C^{16}O^{16}O$) produits par le dioxyde de carbone issu de la combustion de l'échantillon au sein de l'analyseur élémentaire,
- m/z = 28 ($^{12}C^{16}O$) et m/z = 30 ($^{12}C^{18}O$) produits par le monoxyde de carbone issu de la pyrolyse de l'échantillon au sein du pyrolyseur.

4. REACTIFS ET MATERIAUX

Les réactifs et consommables dépendent de l'appareillage utilisé par le laboratoire. Il s'agit généralement d'analyseurs élémentaires pour la combustion de l'échantillon et de pyrolyseurs pour sa pyrolyse. Ces systèmes peuvent être équipés de systèmes automatiques pour l'introduction d'échantillons placés dans des capsules métalliques scellées.

Le laboratoire peut utiliser n'importe quel matériau de référence international certifié en plus de ceux indiqués dans le tableau au point 4.3.

4.1 Consommables

4.1.1. Hélium pour l'analyse (n° CAS : 07440-59-7).

4.1.2. Oxygène pour l'analyse (n° CAS : 07782-44-7).

4.1.3. Réactifs d'oxydation, de réduction et de pyrolyse pour le four et le système de combustion, tels que l'oxyde de cuivre (II) pour l'analyse élémentaire (n° CAS : 1317-38-0) ou le carbone vitreux pour la pyrolyse (n° CAS : 16291-96-6).

4.1.4. Colonne d'alumine (Al_2O_3) et de carbone vitreux pour la pyrolyse.

4.1.5. Agent dessiccateur pour éliminer l'eau produite par la combustion. Par exemple de l'anhydrone pour analyse élémentaire (perchlorate de magnésium) (n° CAS : 10034-81-8). *Pas nécessaire si le*

dispositif est doté d'un système d'élimination de l'eau par piégeage cryogénique ou au moyen d'un capillaire sélectivement perméable.

4.1.6. Capsules jetables en étain et en argent.

4.2 Étalons de travail

4.2.1. Dioxyde de carbone (CO_2) (n° CAS : 00124-38-9) d'une pureté non inférieure à 99,998 % et monoxyde de carbone (CO) (n° CAS : 630-08-0) d'une pureté non inférieure à 99,970 % comme gaz de référence pour la mesure.

4.2.2. Étalons de contrôle et de travail d'acide L(+)tartrique avec des valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{18}O$ calibrées par rapport à des matériaux de référence internationaux.

4.3 Matériaux de référence les plus communément utilisés

Nom	Matériau	$\delta^{13}C$ par rapport à V-PDB ‰	$\delta^{18}O$ par rapport à V-SMOW ‰
CBS (Caribou Hoof Standard)	Sabot de caribou		+2,39 ± 0,13
IAEA-600	Caféine	−27,771 ± 0,043	
IAEA-601	Acide benzoïque	−28,81 ± 0,04	+23,14 ± 0,19
IAEA-602	Acide benzoïque	−28,85 ± 0,04	+71,28 ± 0,36
IAEA-CH-7	Polyéthylène	−32,151 ± 0,05	
KHS (Kudu Horn Standard)	Corne de koudou		+21,21 ± 0,17
NBS22	Huile minérale	−30,031 ± 0,04	
USGS40	Acide glutamique	−26,39 ± 0,04	
USGS24	Graphite	−16,05 ± 0,07	
USGS42	Poudre de cheveux humains (Tibet)	−21,09 ± 0,10	+8,56 ± 0,10
USGS43	Poudre de cheveux humains (Inde)	−21,28 ± 0,10	+14,11 ± 0,10
USGS54	Poudre de bois de *Pinus contorta* canadien	−24,43 ± 0,02	+17,79 ± 0,15
USGS55	Poudre de bois de ziricote mexicain	−27,13 ± 0,02	+19,12 ± 0,07
USGS56	Poudre de bois de *Berchemia zeyheri* sud-africain	−24,34 ± 0,01	+27,23 ± 0,03
USGS90	Farine de millet provenant de Toscane, Italie	−13,75 ± 0,06	+35,90 ± 0,29

5. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et en particulier :

5.1 Spectromètre de masse des rapports isotopiques (SMRI)

Le spectromètre de masse des rapports isotopiques permet de déterminer la teneur relative de l'isotope lourd par rapport à l'isotope léger des gaz CO_2 et CO résultant de la combustion ou de la pyrolyse de l'échantillon, avec une précision interne de 0,1 ‰ pour C et de 0,2 ‰ pour O. On entend par précision interne, la différence entre deux mesures d'un même échantillon de gaz.

Le spectromètre de masse utilisé est généralement équipé d'une série de collecteurs pour mesurer simultanément les courants ioniques m/z = 44, 45, 46 ou m/z = 28, 29, 30.

En mesurant les intensités correspondantes, le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ par exemple est déterminé par les rapports d'intensité de m/z = 45 et m/z = 44 après les corrections relatives à l'espèce isobare $^{12}C^{17}O^{16}O$, dont la contribution peut être calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour m/z = 46 et de l'abondance relative de ^{18}O et de ^{17}O (correction de Craig).

Pour la détermination du rapport isotopique, le spectromètre de masse doit comporter :

- Un système à double introduction (système à double entrée) pour mesurer en alternance l'échantillon et l'étalon de référence,
- Ou un système à flux continu qui transfère quantitativement les gaz résultant de la combustion des échantillons et des étalons de travail dans le spectromètre de masse.

5.2 Analyseur élémentaire (AE) et pyrolyseur (P)

Équipement de combustion et de pyrolyse en mesure de convertir quantitativement l'échantillon en dioxyde de carbone (en cas de combustion) et en monoxyde de carbone (en cas de pyrolyse) ainsi que de séparer les gaz et d'éliminer l'eau sans aucun fractionnement isotopique. Cet équipement peut être soit un système à flux continu intégré au spectromètre de masse, soit un système de combustion autonome. Dans le dernier cas, les gaz sont collectés dans des contenants spéciaux qui sont ensuite reliés au SMRI.

5.3 Microbalance analytique

(intervalle min. : 0-100 mg et précision min. : 0,01 mg) pour mesurer la masse de l'échantillon à analyser (voir 6.2.1).

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Préparation de l'échantillon pour l'analyse

L'analyse est menée sur un échantillon d'acide tartrique en l'état avec une pureté non inférieure à 95 %. Les échantillons sont broyés dans un mortier pour les homogénéiser.

6.2 Analyse des rapports isotopiques

Pour la mesure instrumentale, on applique la procédure recommandée par les techniciens du fabricant dans le manuel de l'appareil.

La description qui suit se réfère au mode opératoire communément utilisé lors de la combustion ou de la pyrolyse d'échantillons au moyen de systèmes de combustion automatisés commerciaux. Il est possible d'utiliser d'autres méthodes qui assurent la conversion quantitative des échantillons en dioxyde de carbone et en monoxyde de carbone sans pertes par évaporation.

6.2.1 Introduction des échantillons dans les capsules et analyse

- Utiliser des capsules, des pinces et un plateau de préparation propres.
- Utiliser des capsules en étain pour la combustion et en argent pour la pyrolyse.
- Prendre une capsule de la bonne taille à l'aide de pinces.
- Introduire la quantité d'échantillon requise dans la capsule.

  Remarque :
  Il est nécessaire d'établir la quantité adéquate d'échantillon à peser de sorte que la quantité de CO (en considérant la pyrolyse) ou de CO_2 (en considérant la combustion) produite par l'échantillon et celle de l'étalon de travail (ou du matériau de référence) ne diffèrent pas de plus de 50 %. Pour se trouver dans cet intervalle d'acceptabilité, une mesure préalable révélant la quantité d'échantillon à peser doit être effectuée (si inconnue).

- Peser à l'aide d'une microbalance analytique.
- Refermer la capsule à l'aide des pinces.
- Préparer au moins deux capsules pour chaque échantillon dans le cas de l'analyse du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ et trois dans le cas de l'analyse du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$.

- Disposer convenablement les capsules dans le tambour de l'échantillon de l'analyseur élémentaire et/ou du pyrolyseur (si disponible). Chaque capsule doit être soigneusement identifiée par ordre numérique.
- Disposer systématiquement les capsules contenant les étalons de travail au début et à la fin de la série d'échantillons.
- Introduire régulièrement des échantillons de contrôle dans la série d'échantillons (ex. un acide tartrique du commerce préalablement calibré, voir point 4.2) afin d'établir une carte de contrôle.

6.2.2 Contrôle et réglage des instruments pour l'analyse isotopique

- Pour une combustion/pyrolyse optimale de l'échantillon, régler la température des fours de l'analyseur élémentaire/du pyrolyseur ainsi que les flux de dioxyde de carbone, d'hélium et d'oxygène gazeux, en suivant les instructions du fabricant,
- Vérifier l'absence de fuites dans le système assurant l'analyse élémentaire/la pyrolyse ainsi que la spectrométrie de masse (par exemple en vérifiant le courant ionique pour le rapport m/z = 40, qui correspond à l'argon),
- Régler le spectromètre de masse en suivant les instructions du fabricant,
- Avant de commencer à effectuer les mesures des échantillons, vérifier le système en utilisant des étalons de travail.

6.2.3 Réalisation des mesures

Les échantillons sont introduits dans l'échantillonneur automatique de l'analyseur élémentaire/du pyrolyseur. Les gaz issus de la combustion de chaque échantillon sont ensuite transférés au sein du spectromètre de masse, qui mesure les courants ioniques. L'ordinateur, relié à l'appareillage, enregistre l'intensité des courants ioniques et calcule les valeurs δ pour chaque échantillon.

7. CALCULS

7.1 Correction et expression des données isotopiques

Selon le protocole de l'IUPAC, les valeurs $^{13}C/^{12}C$ et $^{18}O/^{16}O$ sont exprimées en échelle delta (δ ‰) par rapport aux étalons internationaux V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) et V-SMOW (eau océanique), selon l'équation 1 :

$$\delta_{\mathrm{ref}}({}^{i}E/{}^{j}E, \mathrm{sample}) = \left[\frac{R({}^{i}E/{}^{j}E, \mathrm{sample})}{R({}^{i}E/{}^{j}E, \mathrm{ref})}\right] - 1 \qquad (1)$$

où *ref* est l'étalon international de mesure, *sample* l'échantillon analysé et ${}^{i}E/{}^{j}E$ le rapport isotopique entre les isotopes plus lourds et les plus légers. Les valeurs delta sont multipliées par 1000 et exprimées en unités « pour mille » (‰).

Les données sont généralement fournies par l'instrument et se réfèrent aux gaz étalons utilisés pour l'analyse (CO_2 et CO). Il est nécessaire de procéder à la correction et à la normalisation des données obtenues. Au moins deux matériaux de référence internationaux (voir tableau 4.3.) ou étalons de travail (préalablement étalonnés) doivent être placés au début et à la fin de la séquence analytique et avoir des valeurs certifiées aux extrémités de l'intervalle de mesure, à la fois pour l'analyse du carbone (par ex., USGS 24 et 55) et pour l'analyse de l'oxygène (par ex., IAEA 601 et 602). Les deux points fournis par les matériaux de référence (ou étalons de travail) permettent de construire une droite d'interpolation et de calculer l'équation correspondante qui sert ensuite à corriger l'ensemble des données obtenues.

7.2 Contrôle qualité des analyses

La valeur moyenne obtenue pour les étalons de travail ou internationaux utilisés par le laboratoire doit être comprise dans l'intervalle de validité établi par celui-ci lors de la phase d'étalonnage ou indiqué dans le certificat.

La différence entre les deux mesures répétées d'un même échantillon doit être inférieure à 0,3 ‰ pour l'analyse du carbone et 0,5 ‰ pour celle de l'oxygène.

7.3 Estimation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode

L'étude interlaboratoires a été conduite entre juin et septembre en 2022, avec la participation de neuf laboratoires internationaux différents, et a permis d'estimer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. Les études de répétabilité et de reproductibilité ont été conduites sur cinq échantillons d'acide L-tartrique en double aveugle (10 échantillons au total) présentant des valeurs $\delta^{13}C$ et $\delta^{18}O$ différentes. Chaque laboratoire s'est également vu fournir deux étalons internationaux présentant des valeurs certifiées [CBS, sabot de caribou (avec une valeur certifiée de $\delta^{18}O$ = +2,39 ‰ et de $\delta^{13}C$ = −22,63 ‰) et USGS90, farine de millet (avec une valeur certifiée de $\delta^{18}O$ =

+35,90 ‰ et de $\delta^{13}C$ = −13,75 ‰)] afin de procéder à la correction des données avec une droite à deux points.

Les données de l'étude ont été fournies par :

- Fondazione Edmund Mach – San Michele all'Adige (Trente) – Italie
- Agenzia Dogane Monopoli – Laboratorio chimico di Torino – Turin – Italie
- Imprint Analytics GmbH – Neutal – Autriche
- Hydroisotop GmbH – Stable isotope laboratory – Schweitenkirchen – Allemagne
- Agroisolab GmbH – Jülich – Allemagne
- Eurofins Authenticity Competence Centre – Nantes – France
- TLR international laboratories – Ridderkerk – Pays-Bas (uniquement pour le carbone)
- State scientific research Institute of the brewing and wine industry – Moscou – Russie
- SGS Taiwan Ltd. – Nouveau Taipei – Taïwan

En se basant sur les résultats obtenus (voir tableaux 1 et 2 en annexe I.1), il est possible d'estimer les paramètres de validation suivants :

$\delta^{13}C$ / ‰ vs V-PDB

Échantillon	tartrique 1	tartrique 2	tartrique 3	tartrique 4	tartrique 5
Nombre de résultats valides	9	9	9	9	9
Nombre de répétitions	2	2	2	2	2
Moyenne	−26,49	−30,21	−23,14	−24,81	−22,71
S_r	0,09	0,03	0,03	0,04	0,02
S_R	0,12	0,12	0,09	0,09	0,09

$\delta^{18}O$ / ‰ vs V-SMOW

Échantillon	tartrique 1	tartrique 2	tartrique 3	tartrique 4	tartrique 5
Nombre de résultats valides	8	8	8	8	8
Nombre de répétitions	2	2	2	2	2
Moyenne	13,38	16,24	28,41	38,3	47,14
S_r	0,22	0,15	0,2	0,13	0,26
S_R	0,83	0,69	0,74	0,84	1,08

7.4 Répétabilité et reproductibilité

Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats distincts obtenus sur un échantillon identique par un opérateur utilisant le même appareillage dans l'intervalle de temps le plus court possible n'excédera pas la limite de répétabilité *r* dans plus de 5 % des cas.

Les valeurs acceptées pour l'écart-type relatif de répétabilité (RSDr) sont égales à 0,09 ‰ pour le paramètre $\delta^{13}C$ et à 0,26 ‰ pour le paramètre $\delta^{18}O$.

Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats distincts obtenus sur un échantillon identique par deux laboratoires différents n'excédera pas la limite de reproductibilité *R* dans plus de 5 % des cas.

Les valeurs acceptées pour l'écart-type relatif de reproductibilité (RSDR) sont égales à 0,12 ‰ pour le paramètre $\delta^{13}C$ et à 1,08 ‰ pour le paramètre $\delta^{18}O$.

8. CARACTERISATION ISOTOPIQUE DE L'ACIDE L(+)TARTRIQUE ISSU DU RAISIN

Entre janvier 2019 et décembre 2023, une activité de recherche a été conduite à la Fondazione Edmund Mach de San Michele all'Adige (Trente, Italie), conduisant à la définition des valeurs limites à 95 % de $\delta^{13}C$ et de $\delta^{18}O$ pour un acide L(+)tartrique issu du raisin. 81 échantillons de tartrate de calcium ont été prélevés dans différentes régions du monde (Italie, France, Espagne, Australie et Amérique du sud) représentant les principaux fournisseurs de matière première auprès des entreprises de transformation. Les fournisseurs ont garanti que les échantillons provenaient de lies et de marcs issus de caves n'utilisant pas (là où cela est autorisé) d'acide tartrique de synthèse. Les échantillons ont été transformés en acide L(+)tartrique en laboratoire en utilisant une installation pilote permettant de travailler avec de petites quantités dans les mêmes conditions techniques qu'avec une installation industrielle. Les échantillons ont été purifiés et analysés pour déterminer leurs rapports $\delta^{13}C$ et $\delta^{18}O$.

8.1 Valeurs limites de $\delta^{13}C$ et de $\delta^{18}O$ pour un acide L(+)tartrique issu du raisin

Les valeurs limites indiquées proviennent des données expérimentales présentées dans Perini *et al.*, 2025.

La valeur limite minimale de $\delta^{13}C$ (valeur minimale du jeu de données) pour un acide L(+) tartrique issu du raisin est de −24,6 ‰.

La valeur limite minimale de $\delta^{18}O$ (valeur minimale du jeu de données) pour un acide L(+) tartrique issu du raisin est de +27,8 ‰.

8.2 Guide pour l'interprétation des données isotopiques

Les échantillons présentant des valeurs isotopiques de $\delta^{13}C$ et $\delta^{18}O$ inférieures à la valeur limite établie pour un acide L(+)tartrique issu du raisin au point 8.1, moins l'incertitude, calculée comme $2\times S_R$ (voir point 7.4), doivent être considérés comme non issus du raisin.

9. BIBLIOGRAPHIE

- *Codex œnologique international* et *Code international des pratiques œnologiques*. Disponibles sur : http://www.oiv.int/. Monographie sur l'acide tartrique (COEI-1-DLTART), 2013. F-COEI-1-DLTART.
- Règlement (UE) n° 1622/2000 de la Commission, Journal officiel des Communautés européennes, L 194/1.
- Règlement (UE) n° 1308/2013 de la Commission, Journal officiel des Communautés européennes, L 346/671.
- Règlement délégué (UE) n° 2019/934 de la Commission, Journal officiel des Communautés européennes, L 149/1.
- Moreno Rojas, J.M., Cosofret, S., Reniero, F., Guillou, C., et Serra, F., « Control of oenological products: discrimination between different botanical sources of L-tartaric acid by isotope ratio mass spectrometry », *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21(15), 2007, p. 2447-2450.
- Serra, F., Reniero. F., Guillou, C.G., Moreno, J.M., Marinas, J.M., et Vanhaecke, F., « ^{13}C and ^{18}O isotopic analysis to determine the origin of L-tartaric acid », *Rapid Commun Mass Spectrom*, 19(10), 2005, p. 1227-1230.
- Leirose, G.D., Grenier-Loustalot, M.F., et Heeren de Oliveira, A., « Investigation of Geographical Origin and Production Method of L(+)-Tartaric Acid by Isotopic Analyses with Chemometrics », *J. Chem. Chem. Eng*, 11, 2017, p. 45-50.

- Perini, M., Pianezze, S., Pienti, L., Randi, G. et Larcher R., « L(+)-tartaric acid of grape origin: definition of threshold limits for the $^{13}C/^{12}C$ and $^{18}O/^{16}O$ stable isotope ratios and validation of the isotopic method through an interlaboratory study », *Talanta*, 2025:1. doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128071

Annexe I.1

RÉSULTATS DE L'ÉTUDE INTERLABORATOIRES

Le tableau 1 montre les résultats obtenus pour $\delta^{18}O$ fournis par les différents laboratoires avec une indication du z-score.

Tableau 1 – $\delta^{18}O$ (‰ vs V-SMOW)

Lab.	Éch. 1	Éch. 7	Z-score	Éch. 5	Éch. 9	Z-score	Éch. 2	Éch. 6	Z-score
1	14,65	14,72	1,58	17,31	17,26	1,51	29,32	29,33	1,24
2	14,08	14,26	0,96	16,93	17,01	1,06	29,15	29,30	1,11
3	13,95	13,81	0,61	16,78	16,58	0,64	28,91	29,21	0,88
4	13,03	13,00	−0,44	16,23	15,89	−0,26	28,06	27,51	−0,84
5	13,39	13,45	0,05	15,97	15,93	−0,41	28,03	28,04	−0,50
6	12,91	13,02	−0,50	15,76	15,70	−0,73	28,53	28,54	0,17
7	12,20	12,56	−1,20	15,08	15,38	−1,45	27,56	28,01	−0,84
8	12,13	12,89	−1,05	16,14	15,84	−0,36	27,61	27,39	−1,22
Moyenne		**13,38**			**16,24**			**28,41**	

Lab.	Éch. 3	Éch. 10	Z-score	Éch. 4	Éch. 8	Z-score
1	39,29	39,10	1,07	47,77	47,79	0,59
2	39,08	39,12	0,96	47,99	48,05	0,81
3	38,90	39,20	0,90	48,27	48,32	1,07
4	37,36	37,39	−1,10	45,88	45,25	−1,46
5	37,31	37,35	−1,16	45,75	45,85	−1,24
6	38,73	38,89	0,61	48,01	47,86	0,73
7	37,91	38,21	−0,28	47,20	47,41	0,15
8	37,41	37,50	−1,01	46,84	46,06	−0,64
Moyenne		**38,30**			**47,14**	

Le tableau 2 montre les résultats obtenus pour $\delta^{13}C$ fournis par les différents laboratoires avec une indication du z-score.

Tableau 2 – $\delta^{13}C$ (‰ vs V-PDB)

Lab.	Éch. 1	Éch. 7	Z-score	Éch. 5	Éch. 9	Z-score	Éch. 2	Éch. 6	Z-score
1	−26,43	−26,37	0,76	−30,11	−30,12	0,77	−23,07	−23,06	0,82
2	−26,45	−26,43	0,42	−30,11	−30,17	0,57	−23,12	−23,18	−0,14
3	−26,39	−26,36	0,97	−30,13	−30,08	0,85	−23,03	−23,07	0,99
4	−26,34	−26,72	−0,36	−30,09	−30,07	1,06	−23,06	−23,12	0,54
5	−26,53	−26,48	−0,14	−30,29	−30,36	−0,93	−23,11	−23,11	0,31
6	−26,70	−26,71	−1,86	−30,47	−30,45	−2,02	−23,35	−23,34	−2,34
7	−26,48	−26,50	−0,01	−30,23	−30,21	−0,08	−23,17	−23,17	−0,36
8	−26,51	−26,48	−0,06	−30,26	−30,23	−0,28	−23,13	−23,14	0,03
9	−26,42	−26,49	0,29	−30,19	−30,22	0,04	−23,11	−23,14	0,14
Moyenne		**−26,50**			**−30,22**			**−23,15**	

Lab.	Éch. 3	Éch. 10	Z-score	Éch. 4	Éch. 8	Z-score
1	−24,77	−24,77	0,51	−22,61	−22,61	1,06
2	−24,91	−24,80	−0,48	−22,76	−22,74	−0,44
3	−24,74	−24,72	0,97	−22,64	−22,61	0,90
4	−24,77	−24,72	0,80	−22,71	−22,72	−0,07
5	−24,80	−24,81	0,10	−22,70	−22,69	0,15
6	−25,02	−24,99	−2,22	−22,95	−22,90	−2,31
7	−24,77	−24,78	0,45	−22,68	−22,66	0,41
8	−24,80	−24,81	0,10	−22,67	−22,69	0,31
9	−24,79	−24,88	−0,24	−22,67	−22,75	−0,01
Moyenne		**−24,82**			**−22,72**	

ACIDE L-LACTIQUE, ACIDE D-LACTIQUE, ACIDE D,L-LACTIQUE
Acide 2-hydroxypropanoïque
N° SIN : 270

(Oeno 29/2004 modifiée par Oeno 4/2007)

C.A.S. numéro 50-21-5
(L-: 79-33-4; D-: 10326-41-7; D,L-: 598-82-3)

Formule chimique $C_3H_6O_3$

Masse moléculaire : 90,08, densité 1,20-1,21.

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Acide d'origine naturelle obtenu par la fermentation lactique des sucres ou élaboré synthétiquement; il peut contenir des produits de condensation tels que le lactate de l'acide lactique et le dilactide.
Il est utilisé pour l'acidification des moûts et des vins dans les conditions fixées par la réglementation.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner de manière particulièrement claire s'il s'agit de l'acide L-lactique ou D-Lactique obtenus par fermentation ou D,L-Lactique obtenu par voie chimique, les conditions de conservation, la date limite d'utilisation.
Les produits communs du commerce sont des solutions à 50-90%.
Des produits sous forme solide contenant environ 100-125% d'acide lactique titrable existent également. (note: L'acide lactique est hygroscopique et une fois concentré par ébullition ou par distillation il forme les produits de condensation qui s'hydrolysent en acide lactique par dilution et au chauffage dans l'eau).
Taux de pureté : pas moins de 95,0% et pas plus de 105,0% de la concentration marquée.

3. CARACTERES

Liquide sans couleur ou légèrement jaunâtre et sirupeux, de saveur nettement acide à goût légèrement lacté.

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C : très soluble
Alcool à 95 % vol. : très soluble.
Ether : très soluble
Insoluble dans le chloroforme

5. POUVOIR ROTATOIRE

Pour l'acide L-lactique en solution aqueuse à 2,5 g pour 100 ml.

$\alpha^{D}_{21-22°C}$ est de 2,6°

Pour l'acide D-lactique en solution aqueuse à 8 g pour 100 ml.

$\alpha^{D}_{21-22°C}$ est de -2,6°

6. CARACTERES D'IDENTITE

6.1 Caractérisation de l'acide lactique

Dans une fiole conique de 100 ml peser 10 g d'acide lactique, ajouter 5 ml d'acide sulfurique 0,5 M, agiter, ajouter 25 ml de permanganate de potassium à 0,33 %, placer sur une plaque chauffante. Recueillir les vapeurs dégagées sur un papier filtre imprégné d'une solution à 50% vol/vol de morpholine à 20 % et de nitrocyanoferrate (II) de potassium à 5 %.
Le papier filtre se colore en bleu.

6.2 Dosage de l'acide lactique total

Titrer l'acide lactique libre avec de l'hydroxyde de sodium 1 M puis hydrolyser l'acide lactique polymérisé à l'aide d'un excès d'hydroxyde de sodium dosé en retour par l'acide sulfurique 0,5 M.

6.3 Couleur

Comparer la couleur avec les standards de l'échelle alpha (standards de couleur de platine-cobalt).

6.4 Pureté stéréochimique

La méthode est basée sur la séparation par CLHP utilisant une phase chirale, des deux énantiomères de l'acide lactique, le produit étant préalablement dilué dans l'eau. Des déterminations enzymatiques peuvent également être effectuées selon les méthodes figurant au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

7. ESSAIS

7.1 Préparation de la solution pour essais

Pour les essais de pureté, préparer une solution contenant 10% m/v d'acide lactique, en utilisant la concentration marquée.

7.2 Cendres sulfuriques

A partir d'un échantillon de 2 g d'acide lactique, déterminer les cendres sulfuriques comme il est indiqué au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur doit être inférieure ou égale à 1 g/kg.

7.3 Chlorures

A 0,5 ml de solution préparée pour essais (7.1), ajouter 14,5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). La solution devra satisfaire à l'essai limite des chlorures décrit au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur en chlorures doit être inférieure à 1 g/kg exprimée en acide chlorhydrique.

7.4 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (7.1), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge obtenue ne devra pas être plus intense que celle d'un témoin préparé avec 1 ml d'une solution de sel de fer(III) à 0,010 g de fer par litre (R), 9 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs.

La teneur en fer doit être inférieure à 10 mg/kg.
Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

7.5 Plomb
Sur la solution préparée pour essais (7.1), appliquer la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

7.6 Mercure
Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

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

7.7 Cadmium
Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

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

7.8 Arsenic
Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser l'arsenic selon la méthode décrite en au chapitre II du Codex Œnologique International.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

7.9 Sulfates
A 1 ml de solution préparée pour essais (7.1), ajouter 18 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R) et 2 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R). La solution devra satisfaire à l'essai limite des sulfates décrit au chapitre II du Codex Œnologique international.

La teneur en sulfates doit être inférieure à 1 g/kg, exprimée en acide sulfurique.

7.10 Cyanures
Dans une fiole jaugée de 40 ml contenant 25 ml d'eau distillée et 2,5 ml de solution tampon de pH 7,5 (R), introduire 0,4 ml de la solution préparée pour essais (7.1), ajouter 0,3 ml de solution de chloramine T à 0,1 p. 100 (R). Attendre 90 secondes et ajouter 6 ml de réactif pyridine-pyrazolone (R). Compléter à 40 ml avec de l'eau distillée et mélanger. La coloration obtenue ne doit pas être plus intense que celle obtenue en traitant de la même façon 4 ml d'une solution fraîchement préparée de cyanure de potassium titrant 1 mg d'acide cyanhydrique par litre (R).

La teneur en cyanures libres exprimée en acide cyanhydrique, doit être inférieure à 1 mg/kg.

7.11 Acide citrique

A 5 ml de la solution préparée pour essais (7.1), ajouter 5 ml d'eau, 2 ml de solution de sulfate de mercure(II) (R) , porter à ébullition et ajouter quelques gouttes de la solution de permanganate de potassium à 2 p. 100 (R).
Aucun précipité blanc ne devra se former.

7.12 Acides citrique, oxalique, tartrique, phosphorique

Diluer 1ml de solution préparée pour essais (7.1) dans 10 ml d'eau, ajouter 40 ml d'une solution d'hydroxyde de calcium (R), porter à ébullition pendant 2 minutes.
Aucun trouble ne doit se produire.

7.13. Sucres

Ajouter 2 ml de la solution préparée pour essais (7.1) à 10 ml de réactif cupro-alcalin (R) aucun précipité rouge ne doit se former

8. CONSERVATION

L'acide lactique doit être conservé dans des récipients hermétiquement clos à l'abri de la lumière et de la chaleur.

SOUFRE (DIOXYDE DE) LIQUIDE
Anhydride sulfureux liquide
Sulfuris dioxydum solutum
SO_2 = 64,07
N° SIN: 220
(Oeno 46/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le dioxyde de soufre est un gaz incolore, ininflammable, d'odeur piquante, suffocante. Il est conservé et transporté à l'état liquide dans des récipients en acier résistants. Ces solutions sont instables et ne doivent pas contenir moins de 50 g/l de SO_2.

A la température de 20°C, il est à l'état liquide sous la pression de 3,36 kg par centimètre carré, soit 3,30 bars.

Son point d'ébullition sous la pression normale est de -10°C. La masse volumique ρ_{20}= 1,383.

Produit de la catégorie des agents conservateurs ayant une action antiseptique et antioxydante. Sa teneur dans les vins est soumise au respect des doses limites fixées par la réglementation en vigueur.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la teneur en SO_2 au moment de la mise en vente et les conditions de conservation et de sécurité.

3. SOLUBILITE

Eau à 0°C : 79,79 l de dioxyde de soufre sous la pression normale par litre d'eau.

Eau à 20°C : 39,37 l de dioxyde de soufre sous la pression normale par litre d'eau.

Alcool à 95 % vol. à 20 °C : 114,48 l de dioxyde de soufre par litre d'eau.

Hydrocarbures, corps gras et autres composés organiques : soluble.

4. CARACTERES D'IDENTITE

4.1 Le dioxyde de soufre noircit un papier-filtre imprégné de nitrate de mercure(I).

4.2 Le dioxyde de soufre bleuit un papier-filtre imprégné d'iodate de potassium et d'empois d'amidon. Ensuite, la coloration bleue disparaît par réduction de l'iode initialement libérée.

4.3 Le dioxyde de soufre présente une forte odeur caractéristique.

5. ESSAIS

5.1 Substances non volatiles

Dans un ballon de 500 ml préalablement taré, Recueillir une quantité de dioxyde de soufre liquide de 200 ml. Peser le récipient immédiatement après, soit **p** g la masse prélevée. Laisser spontanément évaporer le dioxyde de soufre en prenant la précaution de ne pas inhaler ces vapeurs suffocantes. Après réchauffement du récipient et élimination du dioxyde de soufre gazeux qu'il contient encore, peser le ballon contenant l'éventuel résidu d'évaporation. La masse de ce résidu doit être inférieure à 0,01 p. 100.

5.2 Préparation de la solution pour essais

Ajouter 2 ml d'acide nitrique concentré (R) et 5 ml d'eau au résidu laissé par évaporation des 200 ml du dioxyde de soufre (5.1). Porter sur un bain d'eau à 100°C pendant 5 minutes. Le volume restant est porté à 200 ml avec de l'eau.

5.3 Cuivre

Prélever une prise d'essai de la solution préparée pour essais (5.2) correspondant à 1 g de dioxyde de soufre liquide ; compléter à 10 ml avec de l'eau distillée et ajouter 0,5 ml de solution chlorhydrique à 10 p. 100 (v/v) d'acide citrique à 15 p. 100 (m/v) (R), 1 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium 5 M (R) et 0,5 ml de solution de diéthyldithiocarbamate de sodium à 1 p. 100 dans l'alcool à 40 % vol. (R). Si une coloration jaune apparaît, elle doit être moins intense que celle obtenue en ajoutant à 1 ml d'une solution de cuivre à 0,01 g par litre (R), 9 ml d'eau, 0,5 ml de solution chlorhydrique à 10 p. 100 (v/v) d'acide citrique à 15 p. 100 (m/v) (R), 1 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium 5 M (R), et 0,5 ml de solution de diéthyldithiocarbamate de sodium à 1 p. 100 dans l'alcool à 40 % vol. (R). (Teneur en cuivre inférieure à 10 mg/kg).

5.4 Fer

Prélever une prise d'essai de la solution préparée pour essais (5.2), correspondant à 1 g de dioxyde de soufre liquide ; compléter à 5 ml avec de l'eau. Ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), une goutte de solution de permanganate de potassium à 1 p. 100 (R) et 5 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). Si une coloration rouge apparaît, elle doit être moins intense que celle d'un témoin préparé avec 5 ml d'une solution de fer à 0,010 g par litre (R) et les mêmes quantités d'acide chlorhydrique et de thiocyanate. (Teneur en fer inférieure à 50 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

5.5 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).
Il est également possible de doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au Recueil.

5.6 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

5.7 Sélénium

Prélever, dans un tube à essais, un volume de solution préparée pour essais (5.2), correspondant à 1,5 g de dioxyde de soufre, compléter à 2 ml avec de l'eau. Ajouter 8 ml d'acide chlorhydrique dilué à 30 p. 100 (R) et 50 mg d'anhydrosulfite de potassium pulvérisé (R) dont on a vérifié qu'il est exempt de sélénium. Après dissolution, placer le tube dans un bain d'eau à 100°C. Après 15 minutes, examiner la coloration du tube.

Si une coloration rose apparaît, elle ne doit pas être plus intense que celle du tube témoin préparé en ajoutant à 0,15 ml d'une solution de dioxyde de sélénium à 100 mg de sélénium par litre (R), 1,85 ml d'eau, 8 ml d'acide chlorhydrique à 30 p. 100 (R) et 50 mg d'anhydrosulfite de potassium pulvérisé exempt de sélénium et en plaçant après dissolution le tube dans un bain d'eau à 100°C pendant 15 minutes. (Teneur en sélénium inférieure à 10 mg/kg).

5.8 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. Teneur inférieure à 3 mg/kg).

6. CONSERVATION

Le dioxyde de soufre doit être conservé et livré à l'état liquide en cylindres métalliques, munis de robinet à pointeau ou à piston, dont la résistance doit être contrôlée périodiquement. Placer les récipients dans un endroit frais.

LYSOZYME
Muramidase
N° SIN :1105 (enzyme 3.2.1.17)

(Oeno 15/2001 modifiée par oeno 4/2007)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le lysozyme (Chlorhydrate de Lysozyme) est extrait du blanc d'œuf comestible de poule. Il est employé en tant qu'inhibiteur de croissance des bactéries. Il peut être utilisé dans les moûts et les vins. Sa dose d'emploi est limitée.
Le lysozyme ne contient ni substances, ni micro-organismes, ni activités enzymatiques collatérales qui peuvent :
- être nuisibles à la santé,
- être nuisibles à la qualité des produits traités,
- conduire à la formation de produits indésirables, ou favoriser des interventions de fraudes.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, ainsi que les conditions de sécurité, de conservation et la date limite d'utilisation.

3. COMPOSITION

C'est un polypeptide naturel constitué par 129 aminoacides dont 21 acides aspartiques, 5 acides glutamiques, 12 alanines, 11 arginines, 8 cystéines, 3 phénylalanines, 12 glycines, 6 isoleucines, 1 histidine, 8 leucines, 6 lysines, 2 prolines, 2 méthionines, 10 sérines, 3 tyrosines, 7 thréonines, 6 tryptophanes et 6 valines.
Il a une masse moléculaire de 14.700 Daltons.
Sa teneur en eau doit être inférieure ou égale à 6 %.

4. CARACTERES

Il se présente sous forme de poudre cristalline, blanche, inodore, d'une saveur douceâtre.

5. SOLUBILITE

Le lysozyme est soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques.

6. CARACTERES D'IDENTITE

Une solution aqueuse à 2 % doit présenter un pH compris entre 3,0 et 3,6.
Une solution aqueuse contenant 25 mg/100 ml présente un maximum d'absorption à 281 nm et un minimum à 252 nm.

7. ACTIVITE ENZYMATIQUE

Son activité enzymatique est capable d'hydrolyser la liaison ß-(1-4) entre l'acide N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine des parois cellulaires des bactéries Gram-positifs.
La concentration minimale du lysozyme est égale à 95 %. Il n'y a pas d'activité enzymatique secondaire.

8. SOURCE DE L'ENZYME ET MOYEN DE PRODUCTION

L'enzyme est extrait du blanc d'œuf comestible de poule par un procédé de séparation sur résine échangeuse d'ions.
La pureté microbiologique garantit la sécurité pour son utilisation dans le domaine alimentaire. Le blanc d'œuf utilisé pour la préparation de l'enzyme est compatible avec les paramètres établis par les organismes de contrôle et est traité en conformité avec les pratiques d'hygiène de fabrication.

9. SUPPORTS DILUANTS, AGENTS DE CONSERVATION ET ADDITIFS

Il n'y a pas d'agent de conservation car la forme cristalline assure la stabilité.

10. ESSAIS

10.1 Cendres sulfuriques
Déterminé comme il est indiqué en annexe, le taux de cendres sulfuriques du lysozyme ne doit pas être supérieur à 1,5 p. 100.

10.2 Azote total
Déterminé selon la méthode décrite en annexe, le taux d'azote total doit être compris entre 16,8 et 17,8% sur matière sèche.

10.3 Préparation de la solution pour essais
Dissoudre 5 g de lysozyme dans 100 ml d'eau.

10.4 Métaux lourds
A 10 ml de solution préparée pour essais (10.3), ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R), 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Aucun précipité ne doit se produire. Si une coloration brune apparaît,

elle doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe (Teneur en métaux lourds exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

10.5 Arsenic
Sur 2 ml de solution préparée pour essais (10.3), rechercher l'arsenic par la méthode indiquée au chapitre II (Teneur en arsenic inférieure à 1 mg/kg).

10.6 Plomb
A partir de la solution préparée pour essais (10.3), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil (Teneur en plomb inférieure à 2 mg/kg).

10.7 Mercure
A partir de la solution préparée pour essais (10.3), doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II (Teneur en mercure inférieure à 1 mg/kg).

10.8 Contaminants biologiques
Détermination effectuée selon la méthode décrite au chapitre II.

Bactéries totales	inférieur à 10^3 UFC par g de préparation
Coliformes	max. 10 par g de préparation
Escherichia coli	absence vérifiée sur un échantillon de 1 g
St. aureus	absence vérifiée sur un échantillon de 1 g
Salmonelles	absence vérifiée sur un échantillon de 25 g
Levures	teneur limite 10^2 UFC par g de préparation
Bactéries lactiques totales	teneur limite : absence contrôlée sur un échantillon de 10 g de préparation
Bactéries acétiques	teneur limite 10^2 UFC par g de préparation
Moisissures	teneur limite 10^2UFC par g de préparation

11. DETERMINATION DE L'ACTIVITE DU LYSOZYME DANS LE VIN (DETERMINATION TURBIDIMETRIQUE)

11.1 Principe
Le procédé analytique est celui établi par FIP (1997), avec des modifications apportées par FORDRAS. La méthode est fondée sur les changements de la turbidité d'une suspension de Micrococcus luteus ATCC 4698 induits par l'action lytique du lysozyme.

Dans des conditions normales d'expérimentation, les changements mentionnés ci-dessus sont proportionnels à la quantité de lysozyme dans le milieu.

11.2 Substrat

Suspendre une certaine quantité (40 - 60 mg) de *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (Boehringer) en poudre dans quelques ml de solution tampon phosphatée M/15 pH 6,6 ($\pm$ 0,1), pour obtenir une suspension homogène et compléter à 100 ml avec le même tampon (utiliser l'agitation manuelle ou un bain ultrasonique; ne pas utiliser un agitateur électromagnétique).

La quantité exacte de *Micrococcus luteus* à prélever dépend du type de spectrophotomètre utilisé.

Préparer un contrôle avec 5 ml de tampon et 5 ml de suspension de *Micrococcus luteus* et mesurer l'absorbance de cette suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm contre une solution de contrôle de tampon phosphaté. L'absorbance ne doit pas être inférieure à 0,800.

Si la lecture ne correspond pas, il faut adapter la teneur de *Micrococcus luteus* dans la suspension et mesurer l'absorbance désirée.

N.B.: Avec un spectrophotomètre sensible, les valeurs d'absorbance de la solution donnée ci-dessus sont 0,800 – 0,900. Des appareils moins sensibles donnent une absorbance inférieure avec cette même suspension (0,500 – 0,600).

Dans ce cas, on ne doit pas augmenter la quantité du substrat pour obtenir les valeurs initiales d'absorbance de 0,800 – 0,900, car la reproductibilité et la linéarité du dosage ne sont pas fiables.

11.3 Préparation de la solution standard

11.3.1 Dissoudre dans de l'eau environ 50 mg de chlorhydrate de lysozyme pesés exactement, et compléter à 100 ml dans une fiole jaugée.

11.3.2 Diluer 5 ml de la solution 11.3.1 avec de l'eau jusqu'à 50 ml.

11.3.3 Diluer 2 ml de cette solution avec un tampon phosphate M/15 jusqu'à 100 ml pour obtenir une solution à 1 mg/l de lysozyme (solution standard).

11.4 Solution à analyser
En relation avec la concentration supposée du lysozyme, diluer l'échantillon de vin avec le tampon phosphate M/15 dans le but d'obtenir la même concentration que la solution standard (1 mg/l).

11.5 Procédé
Préparer les solutions suivantes dans des tubes à essai de 180 × 80 mm.

Solution standard et à analyser	Tampon M/15	Concentration en lysozyme
2,0 ml	3,0 ml	0,4 mg/l
2,8 ml	2,2 ml	0,56 mg/l
4,0 ml	1,0 ml	0,8 mg/l

Il est conseillé de répéter chaque dilution trois fois pour la solution standard ainsi que celle à analyser.
Préparer deux tubes à essai avec 5 ml de tampon comme témoin de la suspension de *Micrococcus luteus*. Utiliser le premier tube témoin au début et le deuxième à la fin de l'essai.
Au bout de 30 secondes exactement, ajouter dans chaque tube à essai 5 ml de suspension de *Micrococcus luteus*, qui doit être maintenue manuellement agitée pour éviter la décantation. Agiter au Vortex les tubes et les tremper exactement 12 minutes dans un bain d'eau à 37°C (± 5°C).
Les quantités finales de lysozyme contenues dans les tubes seront 0,2 – 0,28 – 0,4 mg/l.
Après incubation, prélever à 30 secondes d'intervalle les tubes dans le même ordre d'ajout au bain d'eau.
Agiter et lire l'absorbance au moyen d'un spectrophotomètre à 540 nm pour le vin blanc et à 740 nm pour le vin rouge contre un témoin de tampon.
Normalement, l'essai est acceptable quand la différence entre les valeurs d'absorbance des deux tubes à essai témoins est inférieure à 5%.

11.6 Calcul
Avec les valeurs obtenues, on prépare une courbe standard, indiquant en ordonnée les valeurs moyennes d'absorbance pour chaque

concentration de la solution standard et en abscisse les concentrations en lysozyme sur une échelle logarithmique.
Reporter les résultats obtenus pour les dilutions de la solution à analyser.
Tirer deux lignes droites : une entre les points obtenus pour la solution standard et l'autre entre les points de la solution à analyser. Les deux lignes doivent être parallèles, sinon le dosage est incorrect.

Tracer ensuite une ligne parallèle à l'axe des abscisses de façon à couper les deux lignes droites environ à la moitié de la limite extrême du dosage.

Aux deux points d'intersection correspondent deux concentrations sur l'abscisse (C_{st} concentration de la courbe standard - C_x concentration de la courbe de la solution à analyser).

Calculer l'activité comme suit :

$$\text{Concentration du lysozyme } (\mu g/ml) = \frac{C_{st} \times D}{C_x}$$

où
C_{st} = concentration de la solution standard
C_x = concentration de la solution à analyser
D = facteur de dilution

12. DETERMINATION DU LYSOZYME DANS LE VIN

(Détermination par HPLC)
Le lysozyme résiduel peut être dosé par HPLC selon la méthode figurant au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

13. CONSERVATION

Le lysozyme doit être conservé à température normale en récipient fermé hermétiquement et à l'abri de l'humidité.

14. BIBLIOGRAPHIE

FIP (1997), Pharmaceutical Enzymes, A.Lowers et S.Scharpe ed. 1997, vol. 84 pages 375/379.

ACIDE L-MALIQUE, ACIDE D,L-MALIQUE
Acide 2-hydroxybutanedioïque
N° SIN : 296
C.A.S. numéro 617-48-1
Formule chimique $C_4H_6O_5$
Masse moléculaire : 134.09
(Oeno 30/2004)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION
Acide d'origine naturelle contenu dans la plupart des fruits (il s'agit alors de l'acide L-malique) ou élaboré synthétiquement : D,L-malique.
Il est utilisé pour l'acidification des moûts et des vins dans les conditions fixées par la réglementation.

2. ETIQUETAGE
L'étiquette doit mentionner de manière particulièrement claire qu'il s'agit de l'acide L-malique ou D,L-malique, les conditions de conservation, la date limite d'utilisation.
La teneur en acide malique doit être d'au moins 99 %.

3. CARACTERES
Poudre cristalline ou granulés de couleur blanche ou presque blanche, de saveur nettement acide.
Point de fusion du D,L-malique :127-132 °C.
Point de fusion du L-malique :100 °C.

4. SOLUBILITE
Eau à 20°C : 55,8 g/100 ml
Alcool à 95 %vol. : 45.5 g/100 ml
Ether : 0.84 g/100 ml

5. POUVOIR ROTATOIRE
Pour l'acide L-malique en solution aqueuse à 8,5 g pour 100 ml.

$\alpha_{20°C}^{D}$: -2,3°

6. CARACTERES D'IDENTITE

6.1 Caractérisation de l'acide malique

L'acide malique peut être dosé par voie enzymatique selon les méthodes figurant au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (spécifiquement les acides L-malique et D-malique. L'acide malique peut également être dosé par CLHP selon la méthode figurant au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

7. ESSAIS

7.1 Préparation de la solution pour essais

Pour les essais de pureté, préparer une solution contenant 10% m/v d'acide malique.

7.2 Cendres sulfuriques

A partir d'un échantillon de 2 g d'acide malique, déterminer les cendres sulfuriques comme il est indiqué au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur doit être inférieure ou égale à 1 g/kg.

7.3 Chlorures

A 0,5 ml de solution préparée pour essais (7.1), ajouter 14,5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). La solution devra satisfaire à l'essai limite des chlorures décrit au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur doit être inférieure à 1 g/kg exprimée en acide chlorhydrique.

7.4 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (7.1), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge obtenue ne devra pas être plus intense que celle d'un témoin préparé avec 1 ml d'une solution de sel de fer(III) à 0,010 g de fer par litre (R), 9 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs.
La teneur doit être inférieure à 10 mg/kg.
Le fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.

7.5 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser le plomb selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

7.6 Mercure
Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

7.7 Cadmium
Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

7.8 Arsenic
Sur la solution préparée pour essais (7.1), doser l'arsenic selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

7.9 Sulfates
A 1 ml de solution préparée pour essais (7.1), ajouter 18 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R) et 2 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R). La solution devra satisfaire à l'essai limite des sulfates décrit au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en sulfates doit être inférieure à 1 g/kg, exprimée en acide sulfurique.

7.10 Cyanures
Dans une fiole jaugée de 40 ml contenant 25 ml d'eau distillée et 2,5 ml de solution tampon de pH 7,5 (R), introduire 0,4 ml de la solution préparée pour essais (7.1), ajouter 0,3 ml de solution de chloramine T à 0,1 p. 100 (R). Attendre 90 secondes et ajouter 6 ml de réactif pyridine-pyrazolone (R). Compléter à 40 ml avec de l'eau distillée et mélanger. La coloration obtenue ne doit pas être plus intense que celle obtenue en traitant de la même façon 4 ml d'une solution fraîchement préparée de cyanure de potassium titrant 1 mg d'acide cyanhydrique par litre (R).
La teneur en cyanures libres exprimée en acide cyanhydrique doit être inférieure à 1 mg/kg.

7.11 Sucres

Ajouter 2 ml de la solution préparée pour essais (7.1) à 10 ml de réactif cupro-alcalin (R) aucun précipité rouge n'est formé.

7.12 Acides fumarique et maléique

Taux limite en acide fumarique : 1% en poids.
Taux limite en acide maléique : 0,05% en poids. Ces acides sont dosés par CLHP selon la méthode décrite dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de la même manière que les acides malique et tartrique.

8. CONSERVATION

L'acide malique doit être conservé dans des récipients hermétiquement clos à l'abri de la lumière et de la chaleur.

METATARTRIQUE (ACIDE)
Acide ditartrique
Acidum ditartaricum
N° SIN: 353
(Oeno 31/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

On appelle communément acide métatartrique le produit obtenu par déshydratation ménagée de l'acide L-tartrique par la chaleur entre 150°C et 170°C sous la pression atmosphérique ou sous pression réduite.

Produit permettant de retarder les précipitations tartriques en bouteille.

L'efficacité vis à vis de la prévention des précipitations tartriques est directement fonction du taux d'estérification.

Sa dose d'emploi dans les vins est limitée.

Les principaux constituants de ce produit sont le monoester et le diester ditartrique en proportions variables, provenant de la combinaison de deux molécules d'acide tartrique avec perte d'eau, mélangés à des quantités variables d'acide tartrique non estérifié, d'acide pyruvique et de petites quantités d'acides polyesters mal connus.

Ce produit se présente en masses cristallines ou à l'état de poudre, blanches ou plus ou moins colorées en jaune, à faible odeur de pain grillé ou de caramel ; il est très déliquescent.

Très soluble dans l'eau et dans l'alcool, il est rapidement hydrolysé en solution aqueuse à 100°C, bien plus lentement à froid.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit indiquer le taux d'estérification et les conditions de sécurité et de conservation ainsi que la date limite d'utilisation optimale.

3. CARACTERISATION

3.1 - Une prise d'essai de 1 à 10 mg de cette substance est placée dans un tube avec 2 ml d'acide sulfurique concentré (R) et 2 gouttes de réactif sulforésorcinique (R). Par chauffage à 150°C, une intense coloration violette se développe.

3.2 - Dans un verre cylindrique de 100 ml, placer 2,50 ml d'une solution d'acide tartrique à 10 p. 100 (m/v) dans l'alcool à 20 % vol. Ajouter 10 mg d'acide métatartrique (0,5 ml de la solution à 2 %), 40 ml d'eau et 1 ml d'une solution d'acétate de calcium à 25 p. 100 (m/v) (R). Agiter. Un faible précipité amorphe restant en suspension apparaît pour certains échantillons à indice d'esters élevé,

lorsqu'ils contiennent une petite quantité de polyesters mal connus. Aucun précipité cristallisé ne doit se former dans les 24 heures, tandis que le mélange des mêmes réactifs sans addition d'acide métatartrique présente un précipité cristallisé au bout de quelques minutes.

4. ESSAIS

4.1 Aspect

La solution aqueuse à 10 p. 100 d'acide métatartrique doit être limpide, presque incolore ou légèrement ambrée.

4.2 Préparation de la solution pour essai

Préparer une solution d'acide métatartrique à 20 g/l dans l'eau.

4.3 Dosage

Dans une fiole conique de 250 ml, placer 50 ml de la solution pour essais (4.2) préparée très récemment (1 g d'acide métatartrique) ; ajouter 3 gouttes de solution de bleu de bromothymol à 4 g/l (R) et de la solution d'hydroxyde de sodium 1 M jusqu'à virage au bleu-vert. Soit **n** ml le volume employé.

Ajouter 20 ml de solution 1 M d'hydroxyde de sodium, boucher et abandonner 2 heures à la température ambiante. Titrer par l'acide sulfurique 0,5 M la solution alcaline en excès. Soit **n'** le nombre de millilitres employés : 1 ml de solution 1 M d'hydroxyde de sodium correspond à 0,075 g d'acide tartrique.

Teneur (p. 100 en acide total, libre et estérifié) du produit essayé

$$7{,}5\ (\mathbf{n}+20-\mathbf{n}')$$

Teneur en ester p. 100 des fonctions acides totales

$$\frac{100\ (20-\mathbf{n}')}{(\mathbf{n}+20-\mathbf{n}')}$$

Le produit oenologique doit contenir au minimum 105 p. 100 d'acide tartrique total après hydrolyse et 32 p. 100 d'acide estérifié.

4.4 Métaux lourds

A partir de la solution préparée pour essais, (4.2) déterminer la teneur en métaux lourds selon la méthode au thioacétamide décrite en annexe, (exprimée en plomb, la teneur en métaux lourds doit être inférieure à 10 mg/kg).

4.5 Plomb

A partir de la solution préparée pour essais, (4.2), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur inférieure à 5 mg/kg).

4.6 Mercure

A partir de la solution préparée pour essais, (4.2), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

4.7 Arsenic

A partir de la solution préparée pour essais, (4.2), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

5. CONSERVATION

L'acide métatartrique doit être conservé en récipient hermétiquement clos, à l'abri de l'air et de l'humidité.

CELLULOSE MICROCRISTALLINE
$(C_{12}\ H_{20}\ O_{10})_n$
N° SIN : 460
(Oeno 9/2002)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La cellulose microcristalline est une cellulose purifiée, partiellement dépolymérisée. Elle est obtenue par traitement avec des acides minéraux de l'alpha-cellulose provenant directement de fibres végétales. Sa masse moléculaire est d'environ 36 000.

La cellulose microcristalline joue un rôle de "support" dans les milieux fermentaires très clarifiés, elle augmente ainsi la fermentescibilité des jus.

2. ETIQUETAGE

La concentration du produit doit être indiquée sur l'étiquette, y compris en cas de mélange ainsi que les conditions de conservation.

3. CARACTERES

La cellulose se présente sous forme de poudre microcristalline de couleur blanche ou sensiblement blanche inodore et sans saveur. Elle est pratiquement insoluble dans l'eau, l'acétone, l'éthanol, le toluène, les acides dilués et dans les solutions d'hydroxyde de sodium à 50 g/l.

4. IDENTIFICATION

4.1 Sur un verre de montre, placer 10 mg environ de cellulose microcristalline et disperser dans 2 ml de solution de chlorure de zinc iodé (R), la solution se colore en bleu-violet

4.2 Degré de polymérisation

Dans une fiole conique de 125 ml, placer 1,300 g de cellulose microcristalline. Ajouter 25 ml d'eau (R) et 25 ml de solution d'hydroxyde de cupriéthylènediamine 1M. Faire passer immédiatement un courant d'azote, boucher la fiole et agiter jusqu'à dissolution complète. Transvaser 7 ml de la solution dans un viscosimètre capillaire approprié.

Chronométrer le temps d'écoulement entre deux graduations du viscosimètre et exprimer en secondes le temps mesuré (t_1). Calculer la viscosité cinématique V_1 de la solution d'après la formule :

$$V_1 = t_1(k_1)$$

dans laquelle k_1 est la constante du viscosimètre.

Prélever un volume approprié de solution d'hydroxyde de cuprié thylènediamine 1M et diluer avec le même volume d'eau (R). A l'aide d'un viscosimètre capillaire approprié, déterminer le temps d'écoulement t_2 de cette solution. Calculer la viscosité cinématique V_2 du solvant d'après la formule :

$$V_2 = t_2(k_2)$$

dans laquelle k_2 est la constante du viscosimètre.

Déterminer la viscosité relative η_{rel} de l'échantillon de cellulose microcristalline, d'après la formule :

$$V_1/V_2$$

Déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]c$ par extrapolation, en utilisant la table de viscosité intrinsèque en annexe.
Calculer le degré de polymérisation P, d'après la formule :

$$P = 95[\eta]c/m[(100-b)/100]$$

dans laquelle m est la masse, en grammes de la prise d'essai et b est la valeur obtenue dans l'essai " perte à la dessiccation " en pour cent.
Le degré de polymérisation n'est pas supérieur à 350.

4.3 pH

Agiter pendant 20 minutes environ 5 g de cellulose dans 40 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone. Centrifuger.
Le pH du liquide surnageant doit être compris entre 5,0 et 7,5.

4.4 Substances solubles dans l'éther

Dans un tube de verre de diamètre intérieur de 20 mm environ, préparer une colonne de 10,0 g de cellulose microcristalline.

Faire passer 50 ml d'éther exempt de peroxydes (R) à travers la colonne et évaporer l'éluat à siccité.
La masse du résidu ne doit pas être supérieure à 5,0 mg (0,05 pour cent).

4.5 Substances solubles dans l'eau
Agiter 5,0 g de cellulose microcristalline avec 80 ml d'eau (R) pendant 10 mn. Filtrer sous vide et recueillir le filtrat dans un vase taré. Evaporer sur bain d'eau à 100° C à siccité et dessécher à 100-105°C pendant 1 heure.
La masse du résidu ne doit pas être supérieure à 12,5 mg (0,25 pour cent).

4.6 Amidon
A 10 g de cellulose microcristalline, ajouter 90 ml d'eau (R) et faire bouillir pendant 5 mn. Filtrer à chaud. Refroidir et ajouter au filtrat 0,1 ml d'iode 0,05 M. Il ne doit pas apparaître de coloration bleue.

4.7 Perte à la dessiccation
Placer 1 g de cellulose dans une capsule tarée pendant 3 heures à l'étuve à 100-105°C. La perte à la dessiccation ne doit pas être supérieure à 6,0 pour cent.

Toutes les limites fixées ci-après se rapportent au produit sec.

4.8 Cendres
Incinérer à 600 ± 25°C le résidu obtenu au point 4.7, pendant 4 heures.
Le poids de cendres ne doit pas être supérieur à 0,1 p. 100.

4.9 Préparation de la solution pour essais
Après pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau (R). Chauffer pour activer la dissolution et compléter à 50 ml avec de l'eau.

4.10 Fer
Sur la solution préparée pour essais (4.9), doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique, voir méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en fer doit être inférieure ou égale à 10 mg/kg.

4.11 Plomb
Sur la solution préparée pour essais (4.9), effectuer le dosage du plomb selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

4.12 Mercure
Effectuer le dosage du mercure à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

4.13 Cadmium
Sur la solution préparée pour essais (4.9), effectuer le dosage du cadmium selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

4.14 Arsenic
Effectuer le dosage de l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 1 mg/kg.

4.15 Calcium
Sur la solution préparée pour essais (4.9), effectuer le dosage du calcium par spectrophotométrie d'absorption atomique, voir méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en calcium doit être inférieure à 500 mg/kg.

5. CONSERVATION

La cellulose doit être conservée dans des lieux ventilés dans des emballages étanches à l'abri de substances volatiles qu'elle peut adsorber.

TABLE DE VISCOSITÉ INTRINSÈQUE

Viscosité intrinsèque, [η]c, en fonction de la valeur de la viscosité relative, η_{rel}

[η]c

η_{rel}	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
1,1	0,098	0,106	0,115	0,125	0,134	0,143	0,152	0,161	0,170	0,180
1,2	0,189	0,198	0,207	0,216	0,225	0,233	0,242	0,250	0,259	0,268
1,3	0,276	0,285	0,293	0,302	0,310	0,318	0,326	0,334	0,342	0,350
1.4	0,358	0,367	0,375	0,383	0,391	0,399	0,407	0,414	0,422	0,430
1,5	0,437	0,445	0,453	0,460	0,468	0,476	0,484	0,491	0,499	0.507
1,6	0,515	0,522	0,529	0,536	0,544	0,551	0,558	0,566	0,573	0,580
1,7	0,587	0,595	0,602	0,608	0,615	0,622	0,629	0,636	0,642	0,649
1,8	0,656	0,663	0,670	0,677	0,683	0,690	0,697	0,704	0,710	0,717
1.9	0,723	0,730	0,736	0,743	0,749	0,756	0,762	0,769	0,775	0,782
2.0	0,788	0,795	0,802	0,809	0,815	0,821	0,827	0,833	0,840	0,846
2.1	0,852	0,858	0,864	0,870	0,876	0,882	0,888	0,894	0,900	0,906
2,2	0,912	0,918	0,924	0,929	0,935	0,94	0,948	0,953	0,959	0,965
2,3	0,971	0,976	0,983	0,988	0,994	1,000	1,006	1,011	1,017	1,022
2.4	1,028	1,033	1,039	1,044	1,050	1,056	1,061	1,067	1,072	1,078
2,5	1,083	1,089	1,094	1,100	1,105	1,111	1,116	1,121	1,126	1,131
2,6	1,137	1,142	1,147	1,153	1,158	1,163	1,169	1,174	1,179	1,184
2,7	1,190	1,195	1,200	1,205	1,210	1,215	1,220	1,225	1,230	1,235
2,8	1,240	1,245	1,250	1,255	1,260	1,265	1,270	1,275	1,280	1,285
2,9	1,290	1,295	1,300	1,305	1,310	1,314	1,319	1,324	1,329	1,333
3,0	1,338	1,343	1,348	1,352	1,357	1,362	1,367	1,371	1,376	1,381
3,1	1,386	1,390	1,395	1,400	1,405	1,409	1,414	1,418	1,423	1,427
3,2	1,432	1,436	1,441	1,446	1,450	1,455	1,459	1,464	1,468	1,473
3,3	1,477	1,482	1,486	1,491	1,496	1,500	1,504	1,508	1,513	1,517
3,4	1,521	1,525	1,529	1,533	1,537	1,542	1,546	1,550	1,554	1,558
3,5	1,562	1,566	1,570	1,575	1,579	1,583	1,587	1,591	1,595	1,600
3,6	1;604	1,608	1,612	1,617	1,621	1,625	1,629	1,633	1,637	1,642
3,7	1,646	1,650	1,654	1,658	1,662	1,666	1,671	1,675	1,679	1,683
3,8	1,687	1,691	1,695	1,700	1,704	1,708	1,712	1,715	1,719	1,723
3,9	1,727	1,731	1,735	1,739	1,742	1,746	1,750	1,754	1,758	1,762

4,0	1,765	1,769	1,773	1,777	1,781	1,785	1,789	1,792	1,796	1,800
4,1	1,804	1,808	1,811	1,815	1,819	1,822	1,826	1,830	1,833	1,837
4,2	1,841	1,845	1,848	1,852	1,856	1,859	1,863	1,867	1,870	1,874
4,3	1,878	1,882	1,885	1,889	1,893	1,896	1,900	1,904	1,907	1,911
4,4	1,914	1,918	1,921	1,925	1,929	1,932	1,936	1,939	1,943	1,946
4,5	1,950	1,954	1.957	1,961	1,964	1,968	1,971	1,975	1,979	1,982
4,6	1,986	1,989	1,993	1,996	2,000	2,003	2,007	2,010	2,013	2,017
4,7	2,020	2,023	2,027	2,030	2,033	2,037	2,040	2,043	2,047	2,050
4,8	2,053	2,057	2,060	2,063	2,067	2,070	2,073	2,077	2,080	2,083
4,9	2,087	2,090	2,093	2,097	2,100	2,103	2,107	2,110	2,113	2,116
5,0	2,119	2,122	2,125	2,129	2,132	2,135	2,139	2,142	2,145	2,148
5,1	2,151	2,154	2,158	2,160	2,164	2,167	2,170	2,173	2,176	2,180
5,2	2,183	2,186	2,190	2,192	2,195	2,197	2,200	2,203	2,206	2,209
5,3	2,212	2,215	2,218	2,221	2,224	2,227	2,230	2,233	2,236	2,240
5,4	2,243	2,246	2,249	2,252	2,255	2,258	2,261	2,264	2,267	2,270
5,5	2,273	2,276	2,279	2,282	2,285	2,288	2,291	2,294	2,297	2,300
5,6	2,303	2,306	2,309	2,312	2,315	2,318	2,320	2,324	2,326	2,329
5,7	2,332	2,335	2,338	2,341	2,344	2,347	2,350	2,353	2,355	2,358
5,8	2,361	2,364	2,367	2,370	2,373	2,376	2,379	2,382	2,384	2,387
5,9	2,390	2,393	2,396	2,400	2,403	2,405	2,408	2,411	2,414	2,417
6,0	2,419	2,422	2,425	2,428	2,431	2,433	2,436	2,439	2,442	2,444
6,1	2,447	2,450	2,453	2,456	2,458	2,461	2,464	2,467	2,470	2.472
6,2	2,475	2,478	2,481	2,483	2,486	2,489	2,492	2,494	2,497	2,500
6,3	2,503	2,505	2,508	2,511	2,513	2,516	2,518	2,52	2,524	2,526
6,4	2,529	2,532	2,534	2,537	2,540	2,542	2,545	2,547	2,550	2,553
6,5	2,555	2,558	2,561	2,563	2,566	2,568	2,571	2,574	2,576	2,579
6.6	2,581	2,584	2,587	2,590	2,592	2,595	2,597	2,600	2,603	2,605
6,7	2,608	2,610	2,613	2,615	2,618	2,620	2,623	2,625	2,627	2,630
6,8	2,633	2,635	2,637	2,640	2,643	2,645	2,648	2,650	2,653	2,655
6,9	2,658	2,660	2,663	2,665	2,668	2,670	2,673	2,675	2,678	2,680
7,0	2,683	2,685	2,687	2,690	2,693	2,695	2,698	2,700	2,702	2,705
7,1	2,707	2,710	2,712	2,714	2,717	2,719	2,721	2,724	2,726	2,729
7,2	2,731	2,733	2,736	2,738	2,740	2,743	2,745	2,748	2,750	2,752
7,3	2,755	2,757	2,760	2,762	2,764	2,767	2,769	2,771	2,774	2,776
7,4	2,779	2,781	2,783	2,786	2,788	2,790	2,793	2,795	2,798	2,800

7,5	2,802	2,805	2,807	2,809	2,812	2,814	2,816	2,819	2,821	2,823

7,6	2,826	2,828	2,830	2,833	2,835	2,837	2,840	2,842	2,844	2,847
7,7	2,849	2,851	2,854	2,856	2,858	2,860	2,863	2,865	2,868	2,870
7,8	2,873	2,875	2,877	2,879	2,881	2,884	2,887	2,889	2,891	2,893
7,9	2,895	2,898	2,900	2,902	2,905	2,907	2,909	2,911	2,913	2,915
8,0	2,918	2,920	2,922	2,924	2,926	2,928	2,931	2,933	2,935	2,937
8,1	2,939	2,942	2,944	2,946	2,948	2,950	2,952	2,955	2,957	2,959
8,2	2,961	2,963	2,966	2,968	2,970	2,972	2,974	2,976	2,979	2,981
8,3	2,983	2,985	2,987	2,990	2,992	2,994	2,996	2,998	3,000	3,002
8,4	3,004	3,006	3,008	3,010	3,012	3,015	3,017	3,019	3,021	3,023
8,5	3,025	3,027	3,029	3,031	3,033	3,035	3,037	3,040	3,042	3,044
8,6	3,046	3,048	3,050	3,052	3,054	3,056	3,058	3,060	3,062	3,064
8,7	3,067	3,069	3,071	3,073	3,075	3,077	3,079	3,081	3,083	3,085
8,8	3,087	3,089	3,092	3,094	3,096	3,098	3,100	3,102	3,104	3,106
8,9	3,108	3,110	3,112	3,114	3,116	3,118	3,120	3,122	3,124	3,126
9.0	3,128	3,130	3,132	3,134	3,136	3,138	3,140	3,142	3,144	3,146
9.1	3,148	3.150	3,152	3,154	3,156	3,158	3,160	3.162	3,164	3,166
9,2	3,168	3,170	3,172	3,174	3,176	3,178	3,180	3,182	3,184	3,186
9,3	3,188	3,190	3,192	3,194	3,196	3,198	3,200	3,202	3,204	3,206
9,4	3,208	3,210	3,212	3,214	3,215	3,217	3,219	3,221	3,223	3,225
9,5	3,227	3,229	3,231	3,233	3,235	3,237	3,239	3,241	3,242	3,244
9,6	3,246	3,248	3,250	3,252	3,254	3,256	3,258	3,260	3,262	3,264
9,7	3,266	3,268	3,269	3,271	3,273	3,275	3,277	3,279	3,281	3,283
9,8	3,285	3,287	3,289	3,291	3,293	3,295	3,297	3,298	3,300	3,302
9,9	3,304	3,305	3,307	3,309	3,311	3,313	3,316	3,318	3,320	3,321
10	3,32	3,34	3,36	3,37	3,39	3,41	3,43	3,45	3,46	3,48
11	3,50	3,52	3,53	3,55	3,56	3,58	3,60	3,61	3,63	3,64
12	3,66	3,68	3,69	3,71	3,72	3,74	3,76	3,77	3,79	3,80
13	3,80	3,83	3,85	3,86	3,88	3,89	3,90	3,92	3,93	3,95
14	3,96	3,97	3,99	4,00	4,02	4,03	4,04	4,06	4,07	4,09
15	4,10	4,11	4,13	4,14	4,15	4,17	4,18	4,19	4,20	4,22
16	4,23	4,24	4,25	4,27	4,28	4,29	4,30	4,31	4,33	4,34
17	4,35	4,36	4,37	4,38	4,39	4,41	4,42	4,43	4,44	4,45
18	4,46	4,47	4,48	4,49	4,50	4,52	4,53	4,54	4,55	4,56
19	4,57	4,58	4,59	4,60	4,61	4,62	4,63	4,64	4,65	4,66

MEMBRANES DE NANOFILTRATION
(Oeno 482-2013)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Membrane appartenant à la famille des membranes semi-perméables, elles peuvent être homogènes ou composites, généralement organiques; leur géométrie peut être spiralés ou «spiral wound», film plat ou «frame and plate», tubulaire, à fibres creuses.

La nanofiltration est une technique membranaire sous pression qui couvre un domaine de séparation entre l'osmose inverse et l'ultrafiltration, capable de séparer des molécules en solution de moins de 2 nm environ. La plupart des matériaux membranaires utilisés en nanofiltration comportent des charges de surface qui jouent un rôle dans la séparation des espèces ioniques ; ainsi, des rétentions sélectives d'ions multivalents par rapport à des ions monovalents peuvent être obtenues.

Généralement le MWCO (Molecular Weight Cut Off) de séparation, pour les composés organiques, est variable de 150 à 500 g.mol-1 (150 à 500 daltons), jusqu'au maximum de 2000 g.mol-1 (2000 daltons).

La sélectivité du transfert des solutés à travers la membrane est généralement exprimée par leur taux de rétention (= [1- (conc. finale / conc. initiale)] x 100).

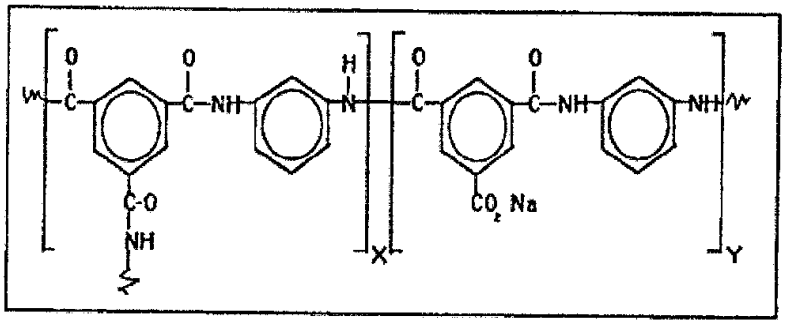
2. PRINCIPE DU PROCEDE

C'est une méthode physique d'élimination d'une partie des solvants (eau et alcool) et des composés en solution de très faibles poids moléculaires du moût ou du vin (voisin du seuil de coupure), à l'aide d'une membrane semi-perméable sous l'action d'un gradient de pression, à température ambiante et sans changement ni altération de son état.
Le processus est conduit en flux tangentiel.
L'appareillage est constitué par exemple d'une pompe haute pression (par exemple de 2 à 8. 10^4 Pa ou 20 à 80 bars) permettant de vaincre la pression osmotique, d'un bloc membrane et des appareils de contrôle, débitmètre, indicateur et régulateur de pression, etc...

3. COMPOSITION

Tous les matériaux mis en œuvre dans la procédure sont en conformité avec la règlementation relative aux matériaux au contact des aliments (tuyaux, pompes, matériel de contrôle, joints, etc..).
Ces membranes sont le plus souvent préparées par polymérisation *in situ* d'un polymère sur la surface d'un substrat poreux. La couche mince sert de membrane discriminante, tandis que le substrat poreux sert de support physique.
Les principaux polymères organiques utilisés peuvent être par exemple : Acétate de cellulose et Polyamide …

A titre d'exemple, la formule structurale de base du polyamide est la suivante :



4. ETIQUETAGE

Les principales caractéristiques doivent être indiquées sur l'étiquette, notamment le numéro de lot.

5. FABRICATION

Par divers procédés il est possible d'obtenir toute la gamme de taille de pores de la micro filtration tangentielle à la membrane dense de l'osmose inverse.
Les caractéristiques finales (épaisseur, porosité, taille de pores, structure interne) de la membrane dépendent d'un grand nombre de paramètres (choix du ternaire solvant/polymère/non-solvant, composition du collodion, ajout de porogènes, conditions opératoires – Température, vitesse de coulage, diamètre/épaisseur du collodion…)

6. NETTOYAGE DES MEMBRANES

L'utilisateur peut employer des produits inorganiques autorisés par la réglementation, à condition de terminer l'opération par un rinçage à l'eau permettant une élimination complète du produit de nettoyage avant l'introduction du moût ou de vin.

7. LIMITES

- Tous les matériaux au contact doivent respecter les normes en vigueur.
- Aucune altération des caractères organoleptiques du moût et du vin après traitement complet ne doit être perceptible.

Tout relargage éventuel de produit ou dérivé constituant la membrane doit respecter les normes en vigueur de migration spécifique des différents constituants des matériaux.

8. CONTRAINTES PARTICULIERES

La membrane doit répondre aux exigences réglementaires des matériaux en contact alimentaire.

AZOTE
Nitrogenum
N = 14,007
N° SIN: 941
(Oeno 19/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Gaz neutre, utilisé pour les opérations d'"inertage" ou de dégazage, il est utilisé pur ou en mélange avec du dioxyde de carbone.

2. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit mentionner la nature du gaz et faire référence à sa composition et sa pureté, les conditions de sécurité doivent aussi être indiquées sur les emballages.

3. CARACTERES

Gaz incolore, inodore et sans saveur. Non inflammable, il n'entretient pas la combustion.

Le poids en gramme du litre d'azote dans les conditions normales est de 1,250.

Sous la pression de 760 mm de mercure et à 20°C, un volume d'eau dissout 0,01507 volume d'azote et un volume d'alcool dissout 0,1224 volume d'azote.

4. ESSAIS

La pureté globale de l'azote employé en œnologie doit atteindre 99 p. 100 d'azote en volumes.

Avant toute mesure il convient de laisser échapper le gaz pendant quelques instants pour purger les canalisations.

La recherche et le dosage des gaz : oxygène, oxyde de carbone, argon, dioxyde de carbone, etc., sont obtenus rapidement par chromatographie en phase gazeuse. (Voir cette méthode en annexe).
On peut également utiliser les méthodes chimiques suivantes.

4.1 Hydrogène phosphoré, hydrogène arsénié et matières réductrices

Faire passer 1 l d'azote dans un mélange de 10 ml de nitrate d'argent ammoniacal (R) et 15 ml d'eau.

Régler le débit d'azote de manière telle que le passage du gaz dans la solution s'effectue en 15 minutes environ.

Il ne doit se produire ni trouble ni brunissement par comparaison avec une solution témoin identique à travers laquelle le gaz ne sera pas passé.

4.2 Oxygène

Préparation du flacon pour la recherche de l'oxygène :

Introduire dans un flacon de 24 ml environ deux fragments de tournure de cuivre de 2 cm^2, 16 ml de solution ammoniacale de sulfate de cuivre (R), puis 2 ml de solution de dichlorhydrate d'hydrazine (R).

Boucher le flacon avec un bouchon de caoutchouc facile à transpercer par une aiguille pour injections hypodermiques. Sertir le col avec une capsule métallique. puis enrober la capsule de cire pour assurer une étanchéité parfaite. Agiter le flacon et laisser au repos à l'abri de la lumière jusqu'à décoloration complète obtenue après environ huit jours.

Conduite de l'essai :

Transpercer le bouchon d'un flacon pour recherche de l'oxygène avec une aiguille de 8/10 de millimètre pour injection hypodermique (prendre soin de ne pas faire plonger celle-ci dans le liquide) qui servira ensuite à l'évacuation du gaz après barbotage. Introduire ensuite une deuxième aiguille de même diamètre amenant le gaz détendu et la faire plonger dans le liquide. Après une minute de barbotage, on ne doit pas observer de coloration appréciable. En présence d'oxygène, le liquide vire rapidement au bleu et la couleur s'intensifie avec le temps.

L'azote doit contenir moins de 10 ml/l d'oxygène.

5. CONDITIONNEMENT

L'azote est livré en cylindres d'acier de forte résistance, peints en noir, munis de robinet à pointeau. La résistance de ces cylindres doit être contrôlée périodiquement.

TANINS ŒNOLOGIQUES

INS N° :181

(OENO 12/2002

Modifiée par OENO 5/2008 et OENO 6/2008

OIV/OENO 352/2009

OIV-OENO 554-2015

OIV-OENO 574-2017

OIV-OENO 624-2022)

1. Généralités

Les tanins œnologiques contiennent des polyphénols. Leur structure complexe est généralement formée d'une grande variété d'unités monomériques liées entre elles de manière covalente.

Ce sont des tanins provenant de différentes parties d'espèces végétales et extraits à l'aide de solvants autorisés par la réglementation en vigueur. Ils sont divisés en deux classes selon la nature des unités monomériques qui les caractérisent : les tanins hydrolysables et les tanins condensés ou les *tanins proanthocyanidiques*. Outre ces deux classes de tanins, chacune des unités monomériques (par ex., monomères flavan-3-ols, acide gallique, acide ellagique, etc.) peut également être présente dans les préparations de tanins.

Les tanins hydrolysables forment une classe hétérogène qui est réparti en 2 sous-classes :

les gallotanins ou tanins galliques, qui consistent en une unité glucose ou une unité acide quinique estérifié avec une ou plusieurs molécules d'acide gallique ou de ses depsides ;

les ellagitanins ou tanins ellagiques, qui consistent en une ou plusieurs unité(s) glucose estérifiée(s) avec une ou plusieurs molécules d'acide ellagique ou similaires. D'autre part, la ou les unité(s) de type osidique peut (vent) être estérifiée(s) avec de l'acide gallique et/ou ses depsides.

La structure des tanins hydrolysables varie en fonction du degré d'estérification et de polymérisation (1).

Les tanins condensés ou proanthocyanidiques (sous-classe des procyanidines et prodelfinidines et sous-classe des profisétinidines et prorobinetidines) sont constitués de polymères de flavan-3-ols. Les unités de flavan-3-ols peuvent différer du point de vue stéréochimique ainsi que par leur degré d'hydroxylation, et peuvent être présentes sous forme d'esters d'acide gallique. La grande variété d'unités monomériques, les diverses liaisons interflavanes et les différents degrés de polymérisation conduisent en un grand nombre de structures possibles de proanthocyanidines. Leur réactivité varie fortement en fonction de leur structure moléculaire.

Les tanins œnologiques se présentent exclusivement sous forme poudre, granules ou paillettes de couleur beige clair ou beige et rouge brique à marron foncé.

Ils peuvent être dissous dans une portion de moût ou de vin pour être incorporés au lot total de moût ou de vin.

2. Etiquetage

L'étiquetage des tanins œnologiques doit préciser :

- l'origine botanique (par exemple chêne, quebracho…),
- la classe à laquelle ils appartiennent (hydrolysables ou condensés),
- la sous-classe (par exemple gallotanins, prodelphinidines etc…),
- le numéro de lot et la date limite d'utilisation,
- la teneur minimale en polyphénols totaux conformément à la méthode décrite en annexe 1,
- les fonctionnalités technologiques,
- les différentes classes ou sous-classes et fonctionnalités technologiques associées en cas de préparations de tanins correspondant à un mélange de plusieurs classes ou sous-classes de tanins,
- le dosage préconisé et les conditions d'utilisation,
- les conditions de conservation pour le maintien de leur stabilité,

- la présence possible de résidus potentiellement allergènes,
- l'indication que les tanins œnologiques ont été obtenus à partir de végétaux génétiquement modifiés, le cas échéant.

3. Tanins œnologiques admis

Les tanins œnologiques décrits au chapitre 1 et présentant des propriétés démontrées et mesurables ainsi qu'un intérêt technologique dûment prouvé dans la pratique et remplissant pleinement les conditions et les critères mentionnés ci-dessous, sont admis conformément aux fiches du Code des pratiques œnologiques.

Les tanins œnologiques utilisés ne doivent pas :

- libérer de substances dans des concentrations qui pourraient induire d'éventuels risques pour la santé,
- constituer une fraude résultant de l'addition d'arômes ou de colorants,
- être nuisible à la qualité des produits élaborés,
- conduire à une modification du profil organoleptique notoire des vins (aromatisation).

4. Fonctionnalités et propriétés de réactivité des tanins œnologiques

4.1. Réactivité

Les tanins sont susceptibles d'être impliqués dans de nombreuses voies réactionnelles dans le vin. La réactivité des tanins œnologiques est directement liée à la spécificité de leurs structures chimiques ; la réactivité dépend aussi des opérations techniques d'élaboration (techniques d'extraction, de concentration, de fractionnement, etc.) qui influencent la teneur en polyphénols (donc le degré de pureté) et la proportion des groupes fonctionnels libres . La nature du végétal détermine la ou les classe(s) de tanins ou sous-classe(s) auxquelles ils appartiennent.

4.2. Propriétés et fonctionalités des tannins

Les fonctionalités des tannins œnologiques sont directement liées à leurs propriétés. Les méthodes d'analyse mises en œuvre pour déterminer les

fonctionalités des tannins doivent correspondre à l'état de l'art et, si possible, être validées selon des standards internationaux appropriés.

Le tableau suivant liste les propriétés et les applications œnologiques dont certaines sont reconnues et d'autres qui devront être démontrées.

Propriétés Théoriques	Applications œnologiques possibles
Réactivité avec les protéines	Adjuvant de clarification
Réactivité à l'oxygène	Anti-oxydant
Chélation du fer	Réduction de la teneur en fer
Polymérisation	Stabilisation de la couleur
Formation de complexess	Stabilisation de la couleur
Activité Anti-laccase	Inhibition de l'activité des laccases
Action microbiologique	
Effet anti-bactérien	Stabilité microbiologique, réduction de l'utilisation du SO_2

Les propriétés et les applications œnologiques qui en découlent feront l'objet de monographies particulières par classe ou sous-classes de tanins, où seront précisées les méthodes de mesure.

4.3. Estimation de la teneur en polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en polyphénols totaux des préparations de tanins œnologiques est mesurée par la méthode décrite en annexe 1.

La teneur en polyphénols totaux doit être supérieure ou égale à 65% et une concentration maximale n'est pas requis.

5. Propriétés physiques

5.1. Matières insolubles

Placer en solution 5 g de tanin dans 100 mL d'eau bidistillée à température ambiante et agiter 15 min. Filtrer cette solution sur une membrane de 0,8 µm préalablement pesée. Évaporer et sécher la membrane à 100-105 °C. Peser la membrane. La teneur en matières

insolubles ne doit pas être supérieure à 5 % w/w. La procédure décrite plus loin dans la méthode pour l'estimation de la teneur en polyphénols totaux (annexe 1, point 4.3) peut être utilisée comme alternative.

5.2. Perte à La dessiccation

Déterminée jusqu'à masse constante, sur une prise d'essai de 2 g, la perte de poids à l'étuve à 100-105 °C, pendant 2 heures, doit être inférieure à 10 %.

6. Teneurs maximales en contaminants

Les tanins œnologiques doivent être produits en accord avec les bonnes pratiques de fabrication. Selon l'origine du végétal mis en œuvre, certaines limites en contaminants comme les métaux lourds peuvent être différentes (par ex., la teneur en fer des tanins issus du châtaignier).

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

6.1. Pentachlorophénol

Procéder au dosage selon la méthode figurant dans le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des moûts et des vins*. La teneur doit être inférieure à 1 µg /kg.

6.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) totaux

Somme du benzo[a]pyrène, du benzo[a]anthracène, du benzo[b]fluoranthène et du chrysène.

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur doit être inférieure à 30 mg/Kg

6.3. Benzo[a]pyrène

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur doit être inférieure à 5 µg/Kg

6.4. Cendres

Incinérer progressivement, sans dépasser 550 °C, le résidu laissé dans la détermination de la perte à la dessiccation. Le poids de cendres doit être inférieur à 5 %. Une concentration plus élevée pourrait indiquer que l'extraction a été réalisée avec des solvants non autorisés.

6.5.Préparation de la solution pour essais

Reprendre les cendres issues de 2 g de tanin par 1 mL d'acide chlorhydrique dilué (R) et une goutte d'acide nitrique concentré (R). Chauffer sur un bain d'eau à 100 °C quelques instants pour préciser la dissolution. Transvaser dans une fiole jaugée de 50 mL en rinçant la capsule avec de l'eau distillée, et compléter au trait de jauge. La solution pour essais est prête à doser les éléments suivants.

6.6.Arsenic

Sur 0,25 g de tanin, rechercher l'arsenic par la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique décrite au Chapitre II du *Codex œnologique international* ou par ICP/MS selon la méthode décrite au recueil des méthodes d'analyses, après destruction de la matière organique par la méthode par voie humide. La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

6.7.Fer

Sur la base de 10 mL de solution pour essais préparée selon 6.5, doser le fer par spectrométrie d'absorption atomique par la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international* ou par ICP/MS selon la méthode décrite au recueil des méthodes d'analyses

La teneur en fer doit être inférieure à 50 mg/kg, à l'exception de la teneur en fer des tanins issus du châtaignier qui doit être inférieure ou égale à 200 mg/kg.

6.8.Cuivre

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international* ou par ICP/MS selon la méthode décrite au recueil des méthodes d'analyses. La teneur doit être inférieure à 5 mg/kg

6.9.Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international* par ICP/MS selon la méthode décrite au recueil des méthodes d'analyses. La teneur doit être inférieure à 5 mg/kg.

6.10. Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international* par ICP/MS selon la méthode décrite au recueil des méthodes d'analyses. La teneur doit être inférieure à 0,5 mg/kg.

6.11. Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international* par ICP/MS selon la méthode décrite au recueil des méthodes d'analyses. La teneur doit être inférieure à 0,5 mg/kg.

6.12. Salmonelles sp.

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

6.13. Coliformes totaux

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur doit être inférieure à 30 UFC/g de matière sèche.

6.14. Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g de matière sèche.

6.15. Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur doit être inférieure à 100 UFC/g de matière sèche.

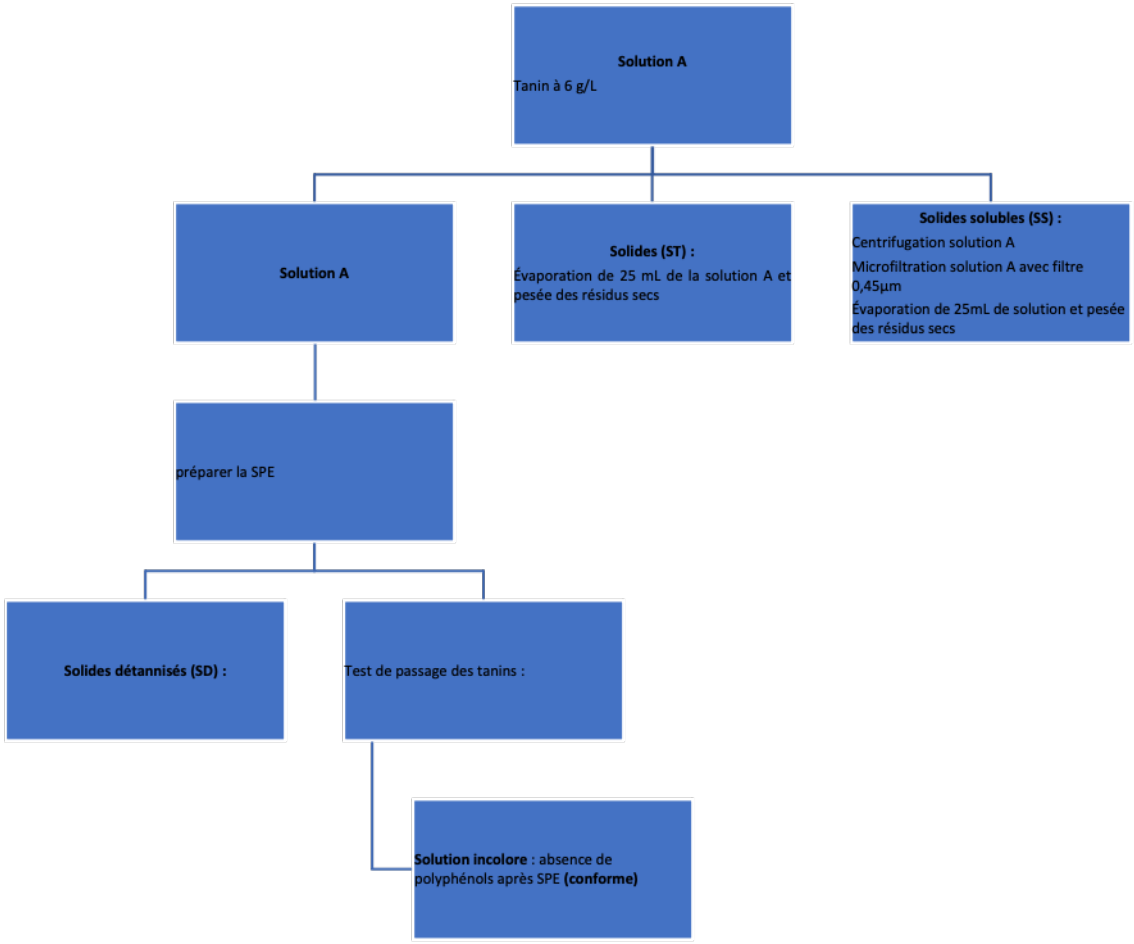
(1) Encyclopaedia health food Pub off 00683

Annexe 1 Méthode pour l'estimation de la teneur en polyphénols totaux

1. Principe

Cette méthode est destinée à mesurer la concentration des préparations de tanins œnologiques en polyphénols ; elle se base sur une analyse gravimétrique réalisée par l'intermédiaire d'une extraction en phase solide ou SPE. Les tanins en solution aqueuse sont adsorbés sur un polymère contenu dans une colonne SPE, en l'occurrence de la polyvinylpolypyrrolidone capable de retenir les polyphénols. Les substances non retenues par la PVPP correspondent à des composés non phénoliques qui étaient présents dans l'échantillon d'origine.

Le diagramme complet de la méthode est présenté ci-dessous :



2. Réactifs, matériel et appareillage

2.1. Réactifs

2.1.1. PVPP (polyvinylpolypyrrolidone d'environ 100 µm, n° CAS 9003-39-8)

2.1.2. Solution aqueuse de $FeCl_3$ (1 g/L)

2.1.3. Eau bidistillée

2.1.4. Éthanol (20 % v/v)

2.2. Matériel

2.2.1. Coupelles en aluminium (70 mL)

2.2.2. Tubes jetables à fond conique avec bouchons (50 mL)

2.2.3. Colonnes SPE (réservoir 70 mL, 150 × 29,75 mm)

2.2.4. Frittés pour colonne SPE (Diamètre 27 mm – 20 µm PE)

2.2.5. Fiole en Pyrex de 1000 mL

2.2.6. Éprouvettes de classe A de 50 mL

2.2.7. Filtre à membrane de 0,45 µm en acétate de cellulose, Ø 47 mm

2.2.8. Seringue en plastique de 50 mL

2.2.9. Pipettes graduées en verre (2 traits) de 25 mL de classe A

2.3. Appareillage

2.3.1. Bain thermostaté à 20 °C

2.3.2. Balance technique d'une précision de 0,01 g

2.3.3. Balance analytique d'une précision de 0,1 mg

2.3.4. Étuve thermostatée à 105 °C

2.3.5. Étuve thermostatée à 80 °C ou, à défaut, bain thermostatique

2.3.6. Centrifugeuse

2.3.7. Collecteur à vide

2.3.8. Verrerie volumétrique de classe A

2.3.9. Dessiccateur

3. Préparation des échantillons

La solution (ci-après, solution A) est utilisée pour mesurer les solides totaux (ST), les solides solubles (SS) et les solides détannisés (SD).

Peser environ 6 g de tanins sur la balance analytique et noter le poids. Dissoudre les tanins dans environ 950 mL d'eau bidistillée chaude (60-70 °C) dans une fiole en verre borosilicaté de 1 litre et bien agiter. Laisser reposer la fiole à température ambiante pendant 30 minutes. Refroidir la solution à 20-22 °C dans un bain thermostaté, compléter le volume avec de l'eau bidistillée et bien mélanger.

4. Mode opératoire

4.1. Mesure des solides totaux (ST)

Prélever et transférer 25 mL de solution A dans une coupelle en aluminium (2.2.1),

faire évaporer à siccité dans une étuve thermostatée à 80 °C,

transférer dans une étuve thermostatée à 105 °C afin de procéder au séchage jusqu'à obtention d'un poids constant, puis peser le résidu (faire refroidir la coupelle dans le dessiccateur avant la pesée).

La formule à appliquer pour le calcul des solides totaux (ST) est la suivante :

4.2. Mesure des solides solubles (SS)

Centrifuger la solution A à 10 000 g pendant 5 minutes,

microfiltrer la solution A centrifugée au travers d'un filtre à membrane afin d'obtenir une solution claire, puis laisser évaporer à siccité 25 mL de solution dans une étuve thermostatée à 80 °C,

transférer dans une étuve thermostatée à 105 °C afin de procéder au séchage jusqu'à obtention d'un poids constant, puis peser le résidu (faire refroidir la coupelle dans le dessiccateur avant la pesée).

La formule à appliquer pour le calcul des solides solubles (SS) est la suivante :

4.3. Mesure des solides insolubles (SI)

Calculer la différence entre les solides totaux et les solides solubles :

4.4. Mesure des solides détannisés (SD*)*

- Préparer les colonnes SPE : introduire le premier fritté, 7,0 0,1 g de PVPP préalablement réhydraté avec une solution hydroalcoolique à 20 % pendant 15 minutes, ainsi que le second fritté, puis bien tasser la phase stationnaire,
- placer la colonne SPE dans le collecteur à vide (exemple en figure 1),
- conditionner la colonne avec trois rinçages (ne pas sécher la PVPP et appliquer un vide d'environ 0,2 bar afin d'éviter le compactage du polymère) : un premier rinçage avec 50 mL d'éthanol (20 % v/v), un deuxième rinçage avec 50 mL d'eau bidistillée, et un troisième rinçage avec 20 mL de solution A afin d'éliminer les résidus d'eau de la PVPP,
- ajouter 30 mL de solution A dans la colonne et recueillir les 30 mL d'éluat (SD, solides détannisés) dans un tube à fond conique Falcon de 50 mL, interrompre l'élution lorsque le liquide atteint le niveau du fritté supérieur,
- prélever 25 mL d'éluat et les transférer dans une coupelle en aluminium,
- laisser évaporer à siccité dans une étuve thermostatée à 80 °C,
- transférer dans une étuve thermostatée à 105 °C afin de procéder au séchage jusqu'à obtention d'un poids constant, puis peser le résidu (faire refroidir la coupelle dans le dessiccateur avant la pesée).

La formule à appliquer pour le calcul des solides détannisés (SD) est la suivante :

où *BC* est la valeur de blanc mesurée après SPE (voir 4.5).

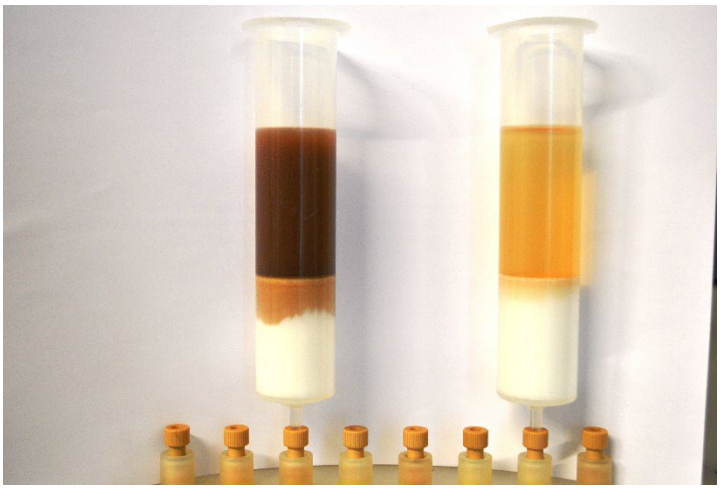


Figure 1 - Exemple d'extraction SPE

Afin de garantir l'absence de polyphénols dans l'éluat après passage dans la colonne, additionner 3 gouttes d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ dans 3 mL de solides détannisés (SD) en solution. Si la solution développe une teinte bleue-noire, cela signifie que des polyphénols sont passés au travers du polymère ; il convient alors de répéter l'analyse en réduisant la quantité de produit initiale. Si la solution se maintient incolore après ce traitement, procéder à l'analyse gravimétrique.

4.5. Mesure du blanc (BC)

Un essai à blanc doit être effectué avant de réaliser l'élution SPE, et cela afin d'évaluer toute interférence causée par le processus analytique. Procéder de la manière suivante :

- préparer les colonnes SPE : introduire le premier fritté, 7,0 0,1 g de PVPP préalablement réhydraté avec une solution hydroalcoolique à 20 % pendant 15 minutes, ainsi que le second fritté, puis bien tasser,

- placer la colonne SPE dans le collecteur à vide (exemple en figure 1),
- conditionner la colonne avec deux rinçages (ne pas sécher le PVPP et appliquer un vide d'environ 0,2 bar afin d'éviter le compactage du polymère) : un premier rinçage avec 50 mL d'éthanol (20 % v/v) et un second rinçage avec 70 mL d'eau bidistillée,
- ajouter 30 mL d'eau bidistillée dans la colonne et recueillir les 30 mL d'éluat (blanc pour solides détannisés) dans un tube à fond conique Falcon de 50 mL, interrompre l'élution lorsque le liquide atteint le niveau du fritté supérieur,
- prélever 25 mL d'éluat et les transférer dans une coupelle en aluminium, puis laisser évaporer à siccité dans une étuve thermostatée à 80 °C,
- transférer dans une étuve thermostatée à 105 °C afin de procéder au séchage jusqu'à obtention d'un poids constant, puis peser les résidus (faire refroidir les coupelles dans le dessiccateur avant la pesée).

5. Expression des résultats

Mesure du pourcentage de polyphénols totaux (%polyphénols) :

La formule à appliquer pour le calcul du pourcentage est la suivante :

Détermination de l'adéquation de la PVPP : se référer à OENO 11-2002 - COEI-1-PVPP : 2007, § 6.

TANINS ŒNOLOGIQUES

Monographies spécifiques sur les procyanidines/ prodelphinidines

(OIV-OENO 675A-2022)

Les procyanidines/prodelphinidines constituent une sous-classe des tanins condensés (ou proanthocyanidiques). Sont inclus dans cette sous-classe les tanins issus de raisins, de pellicules et de pépins de *Vitis vinifera*.

1. Méthode pour la détermination des affiliations aux sous-classes,

1.1. Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

1.1.1. Principe

La présente méthode est conçue pour vérifier la présence de constituants caractéristiques des tanins condensés de la sous classe procyanidines/prodelphinidines et mesurer leur concentration totale. Elle s'applique à des préparations de tanins œnologiques revendiquées pures et ne contenant donc pas des tanins de petites masses de familles ou de sous classes différentes.

1.1.2. Réactifs, matériel et appareillage

1.1.2.1. Réactifs

(+)-catéchine n° CAS 154-23-4

Eau ultra-filtrée (résistivité : 18,3 MΩ.cm)

Eau (qualité CLHP)

Méthanol (qualité CLHP)

Acide formique (qualité CLHP)

1.1.2.2. Matériel

Fiole en verre borosilicaté de 100 mL

Filtre en cellulose d'une porosité de 0,45 µm

Seringue en plastique de 1 mL

1.1.2.3. Appareillage

Balance analytique d'une précision de 0,01 g

Balance analytique d'une précision de 0,1 mg

Verrerie volumétrique de classe A

Système de chromatographie avec détection par spectrométrie de masse composé de :

- pompe à gradient binaire ou quaternaire,
- injecteur à boucle de 10 µL,
- détecteur spectrophotométrique à longueur d'onde fixe de 280 nm, colonne Eclipse Plus C-18 (par exemple) : 2,1 . 100 mm, à particules de 1,8 µm
- source ionisation ESI-SIM (ElectroSprayIonisation-single Ion monitoring)
- détecteur du spectromètre de masse : quadrupôle-temps de vol (Q-TOF).

1.1.3. Préparation des échantillons et des étalons

Échantillons : peser environ 0,5 g de tanins œnologiques sur la balance analytique et noter le poids. Dissoudre les tanins oenologiques dans 100 mL d'eau ultra-filtrée dans une fiole en verre borosilicaté de 100 mL et mélanger soigneusement.

Préparation des solutions d'étalonnage : mettre 10 mg de (+)-catéchine en solution dans 50 mL d'eau ultra-filtrée, soit une concentration de 200 mg/L. Procéder ensuite à des dilutions dans de l'eau ultra-filtrée pour obtenir des concentrations de 5, 10, 20, 40, 60 et 80 et 100 mg/L.

Solvant A : eau qualité CLHP contenant 0,1 % d'acide formique.

Solvant B : méthanol contenant 0,1 % d'acide formique.

1.1.4. Mode opératoire

Filtrer les solutions d'échantillon et étalon sur un filtre d'une porosité de 0,45 µm et les analyser par chromatographie dans les conditions suivantes :

Volume d'injection : 10 µL de solution d'échantillon ou de solution étalon de (+)-catéchine

Détection à 280 nm

Composition du gradient d'élution (temps, % de solvant A) :

0 min, 99,0 % ; 0,5 min, 94,0 % ; 20 min, 50,0 % ; 25 min, 0,0 % ; 32 min, 94,0 % et 10 min pour l'équilibre

Débit : 0,3 mL/min

Détection et quantification de constituants caractéristiques des tanins condensés du sous-groupe (sous classe) procyanidines/prodelphinidines [(+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (+)-gallocatéchine, épigallocatéchine, (-)-épicatéchine-3-*O*-gallate, (-)-épigallocatéchine-3-*O*-gallate, dimères B1, B2, B3 et B4, B2-3-*O*-gallate, trimères] par balayage ESI-SIM et détection Q-Tof (par exemple)

Tableau 1 : Ce tableau est un exemple de formules chimiques et de masses de différents procyanidines/prodelphinidines.

Composés	**Formules chimiques**	**m/z**
(+)-catéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	290.1
(-)-épicatéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	290.1
(-)-épicatéchine-3-O-gallate	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442.1
Dimer B1	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578.1
Dimer B2	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578.1
Dimer B3	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578.1
Dimer B4	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578.1
B2-3-O-gallate	$C_{37}H_{30}O_{16}$	730.1
Trimers	$C_{45}H_{38}O_{18}$	866.2

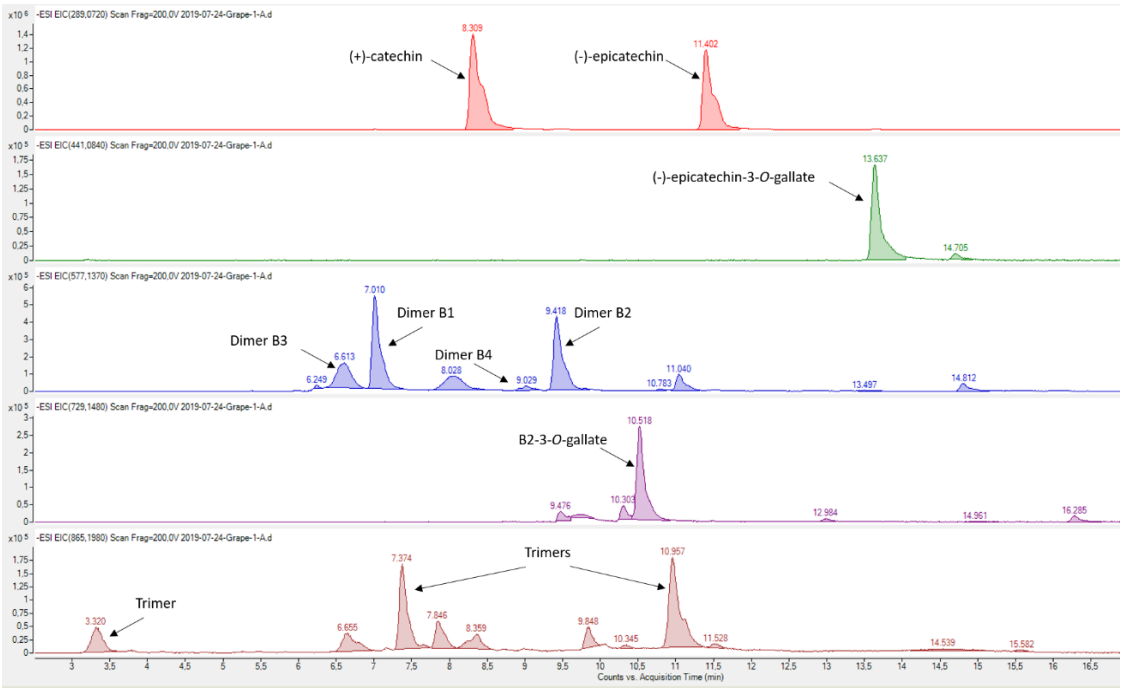


Figure 1. Exemple de balayage ESI-SIM des procyanidines/prodelphinidines

1.2. Conclusion

Un tanin œnologique est identifié comme une procyanidine/prodelphinidine lorsque :

- **sa teneur en polyphénols totaux est supérieure à 65 % (méthode gravimétrique en annexe 1 de la monographie** générale OIV-OENO 624-2022),
- **sa teneur en procyanidines/prodelphinidines évaluée par la méthode CLHP est supérieure à 120 mg équivalent (+)-catéchine par gramme de tanins œnologiques**

2. Méthodes de mesure des propriétés et fonctionnalités

Les méthodes et critères de conformité ci-après ne sont applicables que lorsque la propriété/fonctionnalité est revendiquée sur la préparation de tannins.

2.1.Aptitude antioxydante

2.1.1. Principe

Détermination de l'aptitude des procyanidines/prodelphinidines à contribuer à la protection des moûts et des vins de l'oxydation

2.1.2. Produits

2.1.2.1. Capacité antioxydante

DPPH : (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) : MM = 394,32

Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) : MM = 250,29

Méthanol à 99,9 % vol.

Lecteur de plaques de 96 puits (FLUOstar Omega - BMG Labtech, par exemple)

2.1.2.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Éthanol à 96 % vol, N°CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Chlorure de fer (III) hexahydraté : MM = 270,30, N° CAS 7705-08-0

Sulfate de cuivre (II) pentahydraté : MM = 249,68, N° CAS 7758-98-7

Bouteilles en verre transparent avec pastilles intégrées de capacité 0.75 cL

Oxymètre NomaSense, (par exemple)

2.1.3. Modes opératoires

2.1.3.1. Capacité antioxydante (test DPPH)

Solution de tanins œnologiques à 0,15 g/L : dissoudre 37,5 mg de tanins œnologiques dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5). Une dilution de la solution de tanins œnologiques peut être nécessaire si la mesure de l'absorbance s'avère supérieure à 1 unité (dans ce cas, la dilution doit être prise en compte dans le calcul).

Solution de Trolox à 1 mM : dissoudre 125 mg de Trolox dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Gamme d'étalonnage : dissoudre 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mL de solution de Trolox à 1 mM dans 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 0,9 mL de solution de vin modèle. Ces quantités correspondent respectivement à des concentrations finales de Trolox de 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mM.

Solution de DPPH à 6·10-5 M : dissoudre 2,36 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. La solution doit être fraîchement préparée.

2.1.3.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Solution de tanins œnologiques à 1 g/L : dissoudre 0,75 g de tanins œnologiques dans 750 mL de solution de vin modèle.

Solution de vin modèle : dissoudre 4 g d'acide tartrique, 2,25 mg de chlorure de fer (III) hexahydraté et 0,225 mg de sulfate de cuivre (II) pentahydraté dans 90 mL d'éthanol et 660 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 3,5.

2.1.4. Essais

2.1.4.1. Capacité antioxydante

Mesurer un blanc contenant uniquement le réactif DPPH (BR) à 515 nm en plaçant 190 µL de solution de DPPH (1.3.1) dans chacun des puits de la plaque. Ajouter ensuite 10 µL de solution de tanins œnologiques (échantillons), d'eau distillée (blanc) ou de solution de la gamme d'étalonnage de Trolox (étalons) dans les puits et mesurer (SM) à 515 nm après 30 min.

Un exemple de remplissage de la plaque est présenté en figure 2.

La formule à appliquer pour le calcul de la capacité antioxydante est la suivante :

1)

2)

où « a » et « b » correspondent respectivement à la pente et à la constante de la courbe d'étalonnage du Trolox. Absorbance = f ([Trolox]) → Absorbance = ax + b

Dans tous les cas, les procyanidines/prodelphinidines doivent présenter une capacité antioxydante, et plus concrètement présenter une teneur supérieure à 500 ± 50 mg d'équivalent Trolox par gramme de tanins (extraits commerciaux).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
B	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
C	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
D	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
E	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
F	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
G	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
H	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11

T = Trolox OT = Oenological Tannins

Figure 2. Exemple de plaque de 96 puits

2.1.4.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Saturer la solution de vin modèle avec 8 mg/L d'oxygène en réalisant un barbotage d'air pendant 10 min à 20-25 °C. Ajouter ensuite les tanins œnologiques à la solution de vin modèle dans les bouteilles remplies à 0,75 cL. Fermer hermétiquement les bouteilles et agiter pour obtenir une parfaite homogénéisation.

1. Mesurer l'oxygène consommé tous les deux jours en commençant 1 h après le remplissage des bouteilles.
2. Pour déterminer le taux de consommation d'oxygène, suivre la procédure indiquée en **figure 2** :

- représenter la consommation d'oxygène en fonction du temps,
- représenter ensuite l'inverse de la consommation d'oxygène en fonction de l'inverse du temps,
- le taux de consommation d'oxygène correspond à l'inverse du coefficient de pente :

OCR mg de O_2 par L consommé par jour et par g de tanins = 1/A, A étant le coefficient de pente

Dans tous les cas, les procyanidines/prodelphinidines doivent présenter une aptitude à consommer directement l'oxygène, et plus concrètement être capables de consommer au moins

0,10 · 0,05 mg de O_2 par litre, par jour et par gramme de tanins (extraits commerciaux).

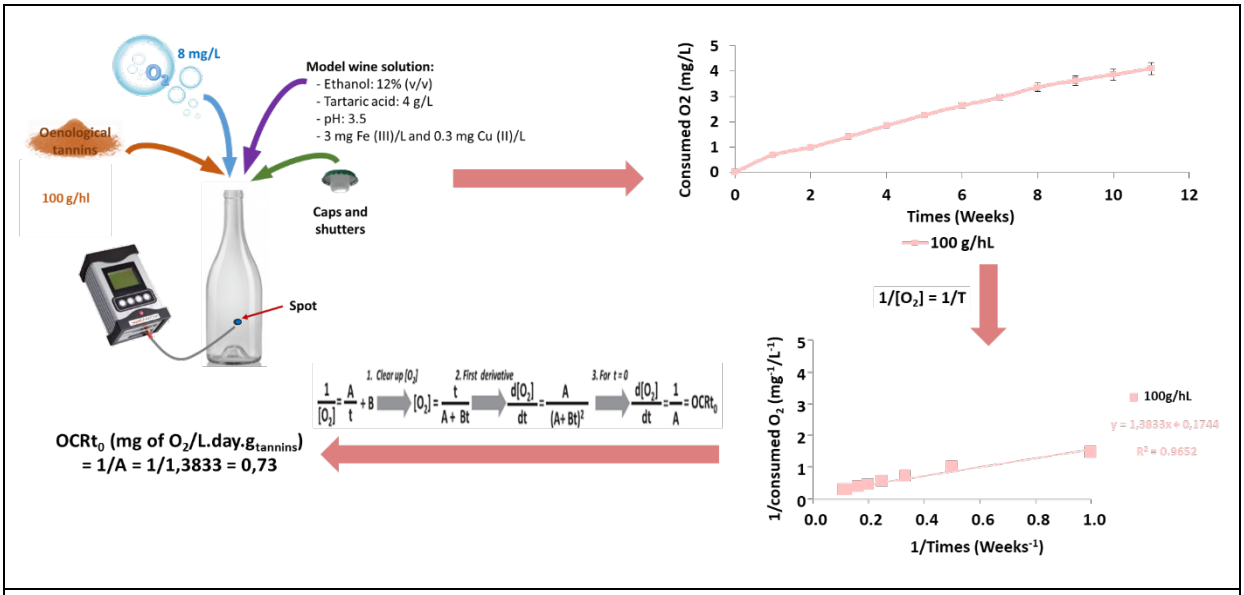


Figure 3. Procédure pour déterminer le taux de consommation d'oxygène

2.1.4.3. Aptitude antioxydasique

2.1.4.3.1. Principe

Détermination de l'aptitude antioxydasique des procyanidines/prodelphinidines à contribuer à la protection antioxydasique par rapport à l'activité laccase, des composés du moût et du vin.

2.1.4.3.2. Produits

Éthanol à 96 % vol, N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Acétate de sodium : MM = 82,03 N° CAS 6131-90-4

Syringaldazine : MM = 360,36 (4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzaldéhyde azine, N°CAS: 14414-32-5) Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), N° CAS 25249-54-1

Moût botrytisé avec une activité laccase

Eau distillée (qualité CLHP)

2.1.4.3.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 2 g/L : dissoudre 200 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution tampon à 8,2 g/L : dissoudre 410 mg d'acétate de sodium dans 50 mL d'eau distillée.

Solution de syringaldazine à 0,06 g/L : dissoudre 30 mg de syringaldazine dans 500 mL d'éthanol.

2.1.4.4. Essais

1. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de tanins œnologiques dans un tube, la solution obtenue correspondant à l'échantillon
2. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de vin modèle dans un tube, la solution obtenue correspondant au témoin.
3. Après (exactement) 4 minutes, ajouter 0,8 g de PVPP dans chacun des tubes (échantillon et témoin), puis agiter et centrifuger pendant 10 min à 8500 tr/min.
4. Prélever 1 mL du surnageant (aussi bien de l'échantillon que du témoin) dans 1,4 mL de solution tampon et 0,6 mL de solution de syringaldazine. Placer le mélange dans une cuvette en plastique de spectrophotomètre (trajet optique de 10 mm).
5. Mesurer l'absorbance à 530 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (temps de référence mesuré à 0 minute inclus).
6. Déterminer ensuite l'activité laccase et l'activité laccase résiduelle au moyen des équations suivantes et de la **figure 3** :

- -

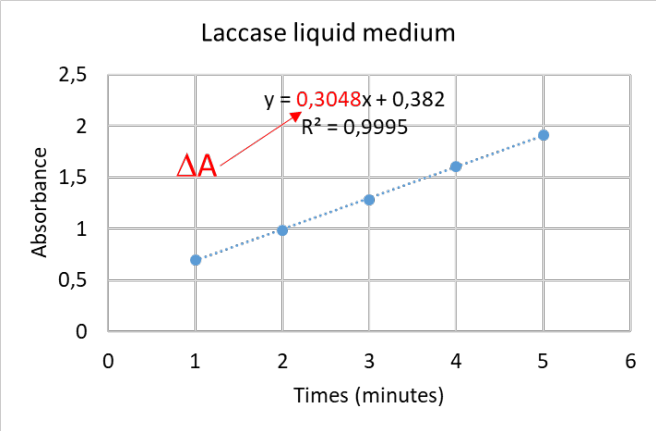


Figure 1. Exemple de détermination de ΔA

Dans tous les cas, les procyanidines/prodelphinidines doivent présenter une aptitude antioxydasique, et plus concrètement être capables de réduire l'activité laccase résiduelle d'au moins 50 %. Cette valeur est valide pour les moûts et les vins contenant moins de 5 UL (unités laccase).

2.1.5. Stabilisation de la couleur

2.1.5.1. Principe

Détermination des propriétés de stabilisation de la couleur des procyanidines/prodelphinidines promouvant l'expression, la stabilisation et la préservation de la couleur dans le moût et le vin rouges.

2.1.5.2. Produits

Éthanol à 96 % vol., N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Malvidine-3-*O*-glucoside : MM = 528,87, N° CAS 18470-06-9

2.1.5.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 0,8 g/L : dissoudre 80 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution de malvidine-3-*O*-glucoside à 0,1 g/L : dissoudre 10 mg de malvidine-3-*O*-glucoside dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

2.1.5.4. Essais

1. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de vin modèle dans un tube cônique à bouchon de 2 mL -ci après désigné tube- et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « ».
2. Placer 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside et 0,75 mL de solution de vin modèle dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « M ».
3. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Cet tube est désigné « ».
4. Après 7 jours, mesurer l'absorbance des trois tubes (, et M) à 450, 520, 570 et 630 nm.
5. Soustraire la valeur de l'absorbance de T_0 à celle de T_M pour obtenir l'absorbance en tenant compte de l'absorbance des tanins œnologiques utilisés.
6. Déterminer ensuite les coordonnés CIELAB (L*, a* et b*) correspondant à la solution de tanins + malvidine-3-*O*-glucoside (T) et à la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) en utilisant le logiciel gratuit MSCV ou équivalent (https ://www.unirioja.es/color/descargas.shtml).

Les formules à appliquer pour le calcul de l'indice de copigmentation sont les suivantes :

1) _____

2) _____

3) Copigmentation Index (%)= _____

- **.TS** : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside contenant des tanins commerciaux (T) et une solution de couleur blanche pure (W).

- **.CS** : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) et une solution de couleur blanche pure (W).

Les coordonnées CIELAB d'une solution de couleur blanche pure sont : L* = 100,00, a* = 0,00 et b* = 0.00.

Dans tous les cas, les procyanidines/prodelphinidines doivent présenter une aptitude à stabiliser la couleur, et plus concrètement présenter un indice de copigmentation supérieur à 7,0 ± 2 % après sept jours.

Remarque : des méthodes de dosage alternatives peuvent être utilisées à la place de toutes les méthodes décrites, à la condition d'avoir fait l'objet d'une validation interne.

1. Bibliographie

- Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J. et Smith, P. A., « Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis », *Australian Journal of Grape Wine Research*, 2006, vol. 12, p.39-49.

- Vignault, A., González-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Iturmendi, N., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution », *Food Chemistry*, 2018, vol. 268, p. 210-219.

- Vignault, A., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F., « Impact of enological tannins on laccase activity », *OENO One,* 2019, vol. 53, p. 27-38.
- Vignault, A., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F., « Recent advances of the OIV working group on oenological tannins in the study of the functionalities of oenological », *BIO Web of Conferences*, 2019, vol. 15, 02015.
- Vignault, A., Gombau, J., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Copigmentation of Malvidin-3-O-Monoglucoside by Oenological Tannins: Incidence on Wine Model Color in Function of Botanical Origin, pH and Ethanol Content », *Molecules*, 2019, vol. 24, p. 1-15.
- Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Oenological tannins to prevent Botrytis cinerea damage in grapes and musts: kinetics and electrophoresis characterization of laccase », *Food Chemistry,* 2020, vol. 316, 126334.
- Vignault, A., « Tanins œnologiques : caractéristiques, propriétés et fonctionnalités. Impact sur la qualité des vins », Thèse de doctorat, Université de Bordeaux et Universitat Rovira i Virgili, 2019

TANINS ŒNOLOGIQUES
Monographies spécifiques sur les ellagitanins
(OIV-OENO 675B-2022)

Les ellagitanins constituent une sous-classe des tanins hydrolysables. Sont inclus dans cette sous-classe les tanins issus du bois de châtaigner et de chêne.

1. Méthode pour la détermination des affiliations aux sous classes

1.1. Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

1.1.1. Principe

La présente méthode est conçue pour vérifier la présence d'ellagitanins dans les tanins œnologiques et mesurer leur concentration totale.

1.1.2. Réactifs, matériel et appareillage

1.1.2.1. Réactifs

Vescalagine (pureté > 96%) n° CAS 36001-47-5

Eau ultra-filtrée (resistivité : 18,3 MΩ.cm)

Eau (qualité CLHP)

Méthanol (qualité CLHP)

Acide formique (qualité CLHP)

1.1.2.2. Matériel

Fiole en verre borosilicaté de 100 mL

Filtre en cellulose d'une porosité de 0,45 µm

Seringue en plastique de 1 mL

1.1.2.3. Appareillage

Balance technique d'une précision de 0,01 g

Balance analytique d'une précision de 0,1 mg

Verrerie volumétrique de classe A

Système de chromatographie avec détection par spectromètrie de masse composé de :

- pompe à gradient binaire ou quaternaire,
- injecteur à boucle de 10 µL,
- détecteur spectrophotométrique à longueur d'onde fixe de 280 nm,
- colonne Phenomenex Kinetex (par exemple) : 150 × 3,0 mm, à particules de 2,6 µm,
- source ionisation ESI-SIM (ElectroSprayIonisation – SingleIon Monitoring)
- détecteur du spectromètre de masse : triple quadrupôle.-temps de vol (Q-Tof)

1.1.3. Préparation des échantillons et des étalons

Échantillons : peser environ 0,5 g de tanins œnologiques sur la balance analytique et noter le poids. Dissoudre les tanins œnologiques dans 100 mL d'eau ultra-filtrée dans une fiole en verre borosilicaté de 100 mL et mélanger soigneusement.

Préparations des solutions d'étalonnage : mettre 10 mg de vescalagine en solution dans 50 mL d'eau ultra-filtrée, soit une concentration de 200 mg/L. Procéder ensuite à des dilutions dans de l'eau ultra-filtrée pour obtenir des concentrations de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 50 et 100 mg/L en vue de la gamme d'étalonnage.

Solvant A : eau (qualité CLHP) contenant 0,1 % d'acide formique (qualité CLHP).

Solvant B : méthanol contenant 0,1 % d'acide formique (qualité CLHP).

1.1.4. Mode opératoire

Filtrer les solutions de tanin œnologique et étalon sur un filtre d'une porosité de 0,45 µm et les analyser par chromatographie dans les conditions suivantes données à titre d'exemple :

Volume d'injection : 10 µL de solution d'échantillon ou de solution étalon de vescalagine

Détection à 280 nm

Composition du gradient d'élution (temps, % de solvant A) :

0 min, 99,0 % ; 2 min, 98,0 % ; 5 min, 97,0 % ; 6 min, 96,5 % ; 7 min, 96,0 % ; 8 min, 95,5 % ; 10 min, 95,0 % ; 14 min, 90,0 % ; 17 min, 85,0 % ; 23 min, 80 % ; 35 min, 1,0 % et 10 min pour l'équilibre

Débit : 0,4 mL/min

Détection et quantification des huit principaux ellagitanins (vescalagine, castalagine, roburines A, B, C, D et E et grandinine) par DAD (UV à 280 nm) ou balayage ESI-SIM et détection Q-Tof par exemple, qui permet une détection et une quantification plus précise.

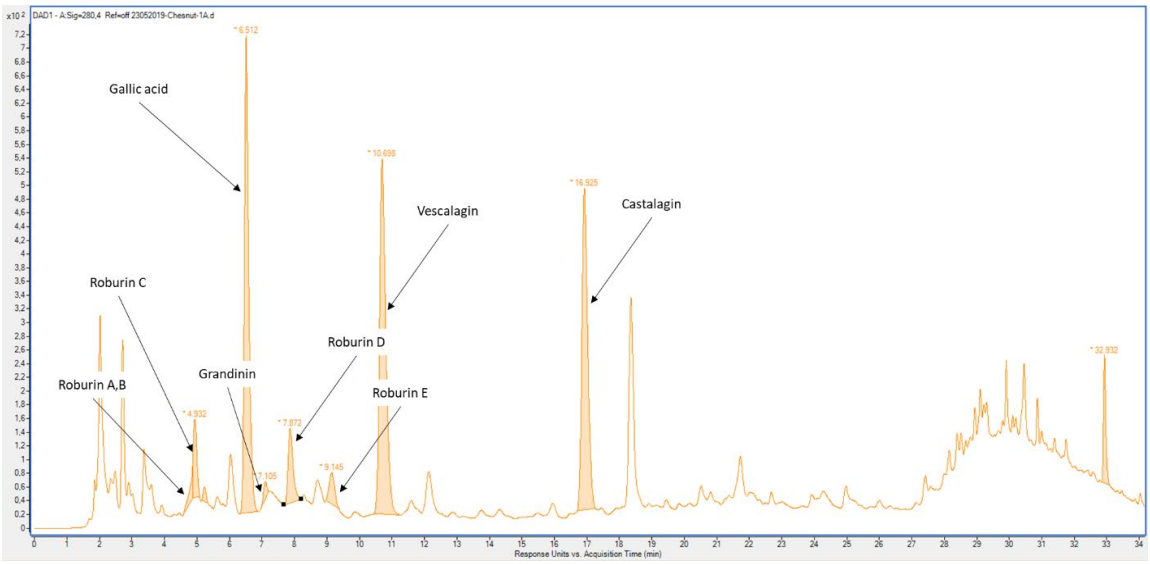


Figure 2. Exemple de chromatogramme des ellagitanins à 280 nm

1.2.Conclusion

Un tanin œnologique est identifié comme un ellagitanin (ou tanin ellagique) lorsque :

- **sa teneur en polyphénols totaux est supérieure à 65 % (méthode gravimétrique en annexe 1 de la monographie générale OIV-OENO 624-2022),**
- **sa teneur en ellagitanins est supérieure à 200 mg équivalent acide gallique par gramme de tanins œnologiques évaluée- par la méthode CLHP**

2. Méthode de mesure des propriétés et fonctionnalités

Les méthodes et critères de conformité ci-après ne sont applicables que lorsque la propriété/fonctionnalité est revendiquée sur la préparation de tannins.

2.1.Aptitude antioxydante

2.1.1. Principe

Détermination de l'aptitude antioxydante des ellagitanins à contribuer à la protection des moûts et des vins de l'oxydation.

2.1.2. Produits

2.1.2.1. Capacité antioxydante

DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) : MM = 394,32

Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) : MM = 250,29,

Méthanol à 99,9 % vol

Lecteur de plaques de 96 puits (FLUOstar Omega - BMG Labtech, par exemple)

2.1.2.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Éthanol à 96 % vol, N°CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Chlorure de fer (III) hexahydraté : MM = 270,30, N° CAS 7705-08-0

Sulfate de cuivre (II) pentahydraté : MM = 249,68, N°CAS 7758-98-7

Bouteilles en verre transparent avec pastilles intégrées de capacité 0,75 L

Oxymètre NomaSense (par exemple).

2.1.3. Modes opératoires

2.1.3.1. Capacité antioxydante (test DPPH)

Solution de tanins œnologiques à 0,15 g/L : dissoudre 37,5 mg de tanins œnologiques dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5). Une dilution de

la solution de tanins œnologiques peut être nécessaire si la mesure de l'absorbance s'avère supérieure à 1 unité (dans ce cas, la dilution doit être prise en compte dans le calcul).

Solution de Trolox à 1 mM : dissoudre 125 g de Trolox dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Gamme d'étalonnage : dissoudre 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mL de solution de Trolox à 1 mM dans 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 0,9 mL de solution de vin modèle. Ces quantités correspondent respectivement à des concentrations finales de Trolox de 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mM.

Solution de DPPH à $6 \cdot 10^{-5}$ M : dissoudre 2,36 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. La solution doit être fraîchement préparée.

2.1.3.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Solution de tanins œnologiques à 1 g/L : dissoudre 0,75 g de tanins œnologiques dans 750 mL de solution de vin modèle.

Solution de vin modèle : dissoudre 4 g d'acide tartrique, 2,25 mg de chlorure de fer (III) hexahydraté et 0,225 mg de sulfate de cuivre (II) pentahydraté dans 90 mL d'éthanol et 660 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 3,5.

2.1.4. Essais

2.1.4.1. Capacité antioxydante

Mesurer un blanc contenant uniquement le réactif DPPH (BR) à 515 nm en plaçant 190 µL de solution de DPPH (1.3.1) dans chacun des puits de la plaque. Ajouter ensuite 10 µL de solution de tanins œnologiques (échantillons), d'eau distillée (blanc) ou de solution de la gamme d'étalonnage de Trolox (étalons) dans les puits et mesurer (SM) à 515 nm après 30 min.

Un exemple de remplissage de la plaque est présenté en figure 2.

La formule à appliquer pour le calcul de la capacité antioxydante est la suivante :

où « a » et « b » correspondent respectivement à la pente et à la constante de la courbe d'étalonnage du Trolox. Absorbance = f ([Trolox]) → Absorbance = ax + b

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une capacité antioxydante, et plus concrètement présenter une teneur supérieure à 600 ˙ 50 mg d'équivalent Trolox par gramme de tanins (extraits commerciaux).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
B	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
C	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
D	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
E	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
F	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
G	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
H	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11

T = Trolox OT = Oenological Tannins

Figure 3. Exemple de plaque de 96 puits

2.1.4.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Saturer la solution de vin modèle avec 8 mg/L d'oxygène en réalisant un barbotage d'air pendant 10 min à 20-25 °C. Ajouter ensuite les tanins œnologiques à la solution de vin modèle dans les bouteilles remplies à 0,75 cL. Fermer hermétiquement les bouteilles et agiter pour obtenir une parfaite homogénéisation.

1. Mesurer l'oxygène consommé tous les deux jours en commençant 1 h après le remplissage des bouteilles.
2. Pour déterminer le taux de consommation d'oxygène, suivre la procédure indiquée en figure 2 :

- représenter la consommation d'oxygène en fonction du temps,
- représenter ensuite l'inverse de la consommation d'oxygène en fonction de l'inverse du temps,

- le taux de consommation d'oxygène correspond à l'inverse du coefficient de pente :

OCR mg de O_2 par L consommé par jour et par g de tanins = 1/A, A étant le coefficient de pente

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une aptitude à consommer directement l'oxygène, et plus concrètement être capables de consommer au moins 0,50 ± 0,05 mg de O_2 par litre, par jour et par gramme de tanins (extraits commerciaux).

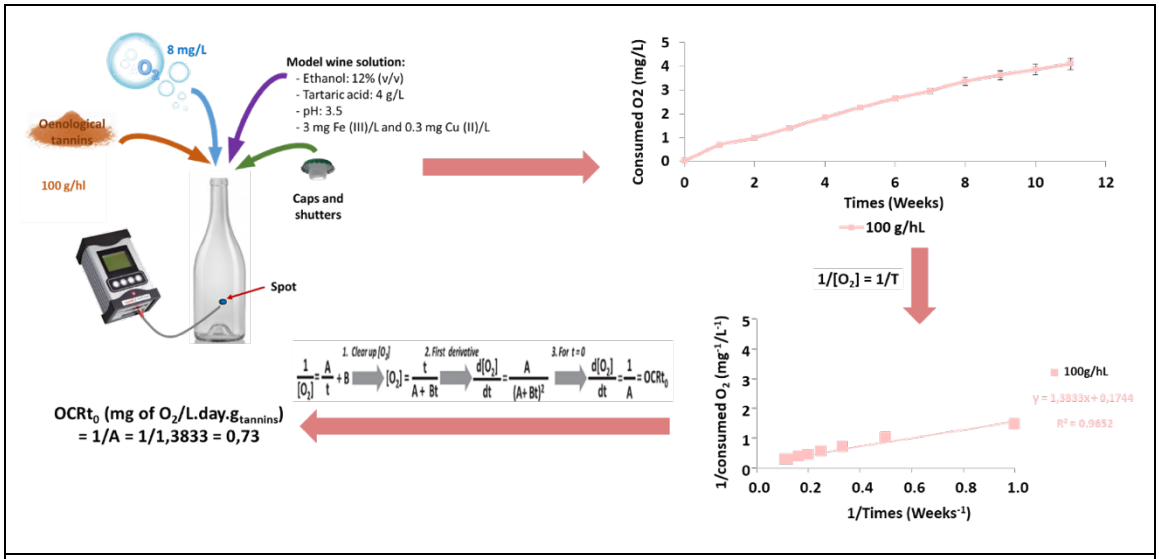


Figure 4. Procédure pour déterminer le taux de consommation d'oxygène

2.2.Aptitude antioxydasique

2.2.1. Principe

Détermination de l'aptitude antioxydasique des ellagitanins à contribuer à la protection antioxydasique par rapport à l'activité laccase des composés du moût et du vin.

2.2.2. Produits

Éthanol à 96 % vol, N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Acétate de sodium : MM = 82,03, N° CAS 6131-90-4

Syringaldazine (4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzaldéhyde azine) : MM = 360,36 , N°CAS: 14414-32-5

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), N° CAS 25249-54-1

Moût botrytisé avec une activité laccase

Eau distillée (qualité CLHP)

2.2.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 2 g/L : dissoudre 200 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution tampon à 8,2 g/L : dissoudre 410 mg d'acétate de sodium dans 50 mL d'eau distillée.

Solution de syringaldazine à 0,06 g/L : dissoudre 30 mg de syringaldazine dans 500 mL d'éthanol.

2.2.4. Essais

1. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de tanins œnologiques dans un tube, la solution obtenue correspondant à l'échantillon.
2. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de vin modèle dans un tube, la solution obtenue correspondant au témoin.
3. Après (exactement) 4 minutes, ajouter 0,8 g de PVPP dans chacun des tubes (échantillon et témoin), puis agiter et centrifuger pendant 10 minutes à 8500 tr/minute.
4. Prélever 1 mL du surnageant (aussi bien de l'échantillon que du témoin) dans 1,4 mL de solution tampon et 0,6 mL de solution de syringaldazine. Placer le mélange dans une cuvette en plastique de spectrophotomètre (trajet optique de 10 mm).
5. Mesurer l'absorbance à 530 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (temps de référence mesuré à 0 minute inclus).

6. Déterminer ensuite l'activité laccase et l'activité laccase résiduelle au moyen des équations suivantes et de la figure 3 :

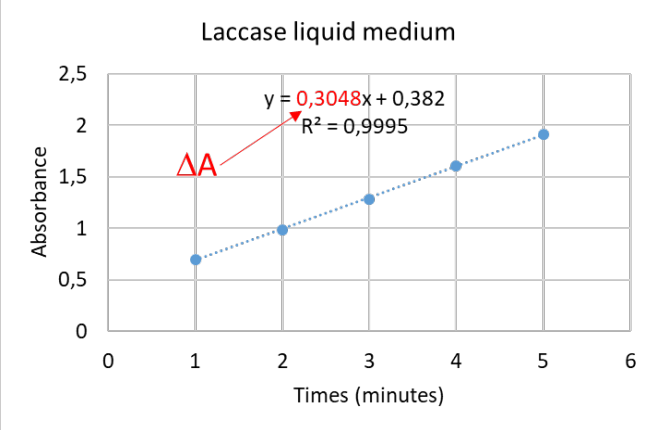


Figure 5. Exemple de détermination de

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une aptitude antioxydasique, et plus concrètement être capables de réduire l'activité laccase résiduelle d'au moins 40 %. Cette valeur est valide pour les moûts et les vins contenant moins de 5 UL (unités laccase).

2.3.Stabilisation de la couleur

2.3.1. Principe

Détermination des propriétés de stabilisation de la couleur des ellagitanins promouvant l'expression, la stabilisation et la préservation de la couleur dans le moût et le vin rouges.

2.3.2. Produits

Éthanol à 96 % vol., N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Malvidine-3-*O*-glucoside : MM = 528,87, N° CAS 18470-06-9

2.3.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 0,8 g/L : dissoudre 80 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution de malvidine-3-*O*-glucoside à 0,1 g/L : dissoudre 10 mg de malvidine-3-*O*-glucoside dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

2.3.4. Essais

1. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de vin modèle dans tube cônique à bouchon de 2 mL -noté tube- et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « T_0 ».

2. Placer 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside et 0,75 mL de solution de vin modèle dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « M ».

3. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « T_M ».

4. Après 7 jours, mesurer l'absorbance des trois tubes (T_M, T_0 et M) à 450, 520, 570 et 630 nm.

5. Soustraire la valeur de l'absorbance de T_0 à celle de T_M pour obtenir l'absorbance en évitant les interférences dues à la couleur « naturelle » des tanins œnologiques.

$A(\dot{\ }) - A(\dot{\ }) = A(T)$

6. Déterminer ensuite les coordonnés CIELAB (L*, a* et b*) correspondant à la solution de tanins + malvidine-3-*O*-glucoside (T) et à la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) en utilisant le logiciel gratuit MSCV ou équivalent (https://www.unirioja.es/color/descargas.shtml).

Les formules à appliquer pour le calcul de l'indice de copigmentation sont les suivantes :

- .TS : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside contenant des tanins commerciaux (T) et une solution de couleur blanche pure (W).

- .CS : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) et une solution de couleur blanche pure (W).

Les coordonnées CIELAB d'une solution de couleur blanche pure sont : L* = 100,00, a* = 0,00 et b* = 0,00.

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une aptitude à stabiliser la couleur, et plus concrètement présenter un indice de copigmentation supérieur à 10,0 ± 2 % après sept jours.

Remarque : des méthodes de dosage alternatives peuvent être utilisées à la place de toutes les méthodes décrites, à la condition d'avoir fait l'objet d'une validation interne.

3. Bibliographie

- Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J. et Smith, P. A., « Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis », *Australian Journal of Grape Wine Research*, 2006, vol. 12, p.39-49.

- Vignault, A., González-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Iturmendi, N., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution », *Food Chemistry*, 2018, vol. 268, p. 210-219.

- Vignault, A., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F., « Impact of enological tannins on laccase activity », *OENO One,* 2019, vol. 53, p. 27-38.

- Vignault, A., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F., « Recent advances of the OIV working group on oenological tannins in the study of the functionalities of oenological », *BIO Web of Conferences*, 2019, vol. 15, 02015.
- Vignault, A., Gombau, J., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Copigmentation of Malvidin-3-O-Monoglucoside by Oenological Tannins: Incidence on Wine Model Color in Function of Botanical Origin, pH and Ethanol Content », *Molecules*, 2019, vol. 24, p. 1-15.
- Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Oenological tannins to prevent Botrytis cinerea damage in grapes and musts: kinetics and electrophoresis characterization of laccase », *Food Chemistry,* 2020, vol. 316, 126334.
- Vignault, A., « Tanins œnologiques : caractéristiques, propriétés et fonctionnalités. Impact sur la qualité des vins », Thèse de doctorat, Université de Bordeaux et Universitat Rovira i Virgili, 2019.

TANINS ŒNOLOGIQUES

Monographies spécifiques sur les gallotanins

(OIV-OENO 675C-2022)

Les ellagitanins constituent une sous-classe des tanins hydrolysables. Sont inclus dans cette sous-classe les tanins issus du bois de châtaigner et de chêne.

1. Méthode pour la détermination des affiliations aux sous classes

1.1. Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

1.1.1. Principe

La présente méthode est conçue pour vérifier la présence d'ellagitanins dans les tanins œnologiques et mesurer leur concentration totale.

1.1.2. Réactifs, matériel et appareillage

1.1.2.1. Réactifs

Vescalagine (pureté > 96%) n° CAS 36001-47-5

Eau ultra-filtrée (resistivité : 18,3 MΩ.cm)

Eau (qualité CLHP)

Méthanol (qualité CLHP)

Acide formique (qualité CLHP)

1.1.2.2. Matériel

Fiole en verre borosilicaté de 100 mL

Filtre en cellulose d'une porosité de 0,45 µm

Seringue en plastique de 1 mL

1.1.2.3. Appareillage

Balance technique d'une précision de 0,01 g

Balance analytique d'une précision de 0,1 mg

Verrerie volumétrique de classe A

Système de chromatographie avec détection par spectromètrie de masse composé de :

- pompe à gradient binaire ou quaternaire,
- injecteur à boucle de 10 µL,
- détecteur spectrophotométrique à longueur d'onde fixe de 280 nm,
- colonne Phenomenex Kinetex (par exemple) : 150 × 3,0 mm, à particules de 2,6 µm,
- source ionisation ESI-SIM (ElectroSprayIonisation – SingleIon Monitoring)
- détecteur du spectromètre de masse : triple quadrupôle.-temps de vol (Q-Tof)

1.1.3. Préparation des échantillons et des étalons

Échantillons : peser environ 0,5 g de tanins œnologiques sur la balance analytique et noter le poids. Dissoudre les tanins œnologiques dans 100 mL d'eau ultra-filtrée dans une fiole en verre borosilicaté de 100 mL et mélanger soigneusement.

Préparations des solutions d'étalonnage : mettre 10 mg de vescalagine en solution dans 50 mL d'eau ultra-filtrée, soit une concentration de 200 mg/L. Procéder ensuite à des dilutions dans de l'eau ultra-filtrée pour obtenir des concentrations de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 50 et 100 mg/L en vue de la gamme d'étalonnage.

Solvant A : eau (qualité CLHP) contenant 0,1 % d'acide formique (qualité CLHP).

Solvant B : méthanol contenant 0,1 % d'acide formique (qualité CLHP).

1.1.4. Mode opératoire

Filtrer les solutions de tanin œnologique et étalon sur un filtre d'une porosité de 0,45 µm et les analyser par chromatographie dans les conditions suivantes données à titre d'exemple :

Volume d'injection : 10 µL de solution d'échantillon ou de solution étalon de vescalagine

Détection à 280 nm

Composition du gradient d'élution (temps, % de solvant A) :

0 min, 99,0 % ; 2 min, 98,0 % ; 5 min, 97,0 % ; 6 min, 96,5 % ; 7 min, 96,0 % ; 8 min, 95,5 % ; 10 min, 95,0 % ; 14 min, 90,0 % ; 17 min, 85,0 % ; 23 min, 80 % ; 35 min, 1,0 % et 10 min pour l'équilibre

Débit : 0,4 mL/min

Détection et quantification des huit principaux ellagitanins (vescalagine, castalagine, roburines A, B, C, D et E et grandinine) par DAD (UV à 280 nm) ou balayage ESI-SIM et détection Q-Tof par exemple, qui permet une détection et une quantification plus précise.

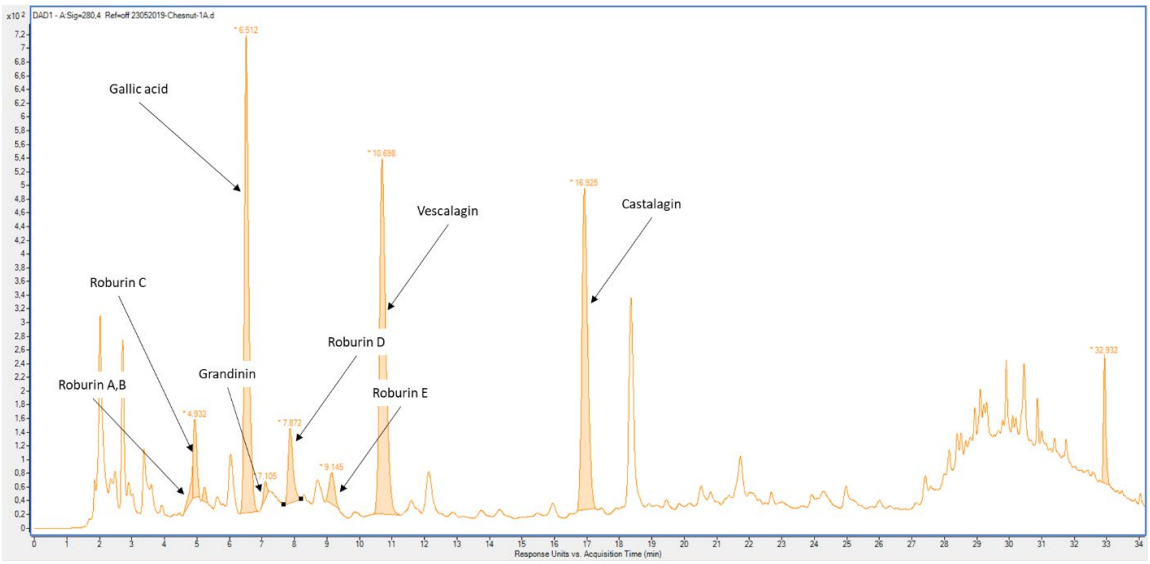


Figure 6. Exemple de chromatogramme des ellagitanins à 280 nm

1.2.Conclusion

Un tanin œnologique est identifié comme un ellagitanin (ou tanin ellagique) lorsque :

- **sa teneur en polyphénols totaux est supérieure à 65 % (méthode gravimétrique en annexe 1 de la monographie générale OIV-OENO 624-2022),**
- **sa teneur en ellagitanins est supérieure à 200 mg équivalent acide gallique par gramme de tanins œnologiques évaluée- par la méthode CLHP**

2. Méthode de mesure des propriétés et fonctionnalités

Les méthodes et critères de conformité ci-après ne sont applicables que lorsque la propriété/fonctionnalité est revendiquée sur la préparation de tannins.

2.1.Aptitude antioxydante

2.1.1. Principe

Détermination de l'aptitude antioxydante des ellagitanins à contribuer à la protection des moûts et des vins de l'oxydation.

2.1.2. Produits

2.1.2.1. Capacité antioxydante

DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) : MM = 394,32

Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) : MM = 250,29,

Méthanol à 99,9 % vol

Lecteur de plaques de 96 puits (FLUOstar Omega - BMG Labtech, par exemple)

2.1.2.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Éthanol à 96 % vol, N°CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Chlorure de fer (III) hexahydraté : MM = 270,30, N° CAS 7705-08-0

Sulfate de cuivre (II) pentahydraté : MM = 249,68, N°CAS 7758-98-7

Bouteilles en verre transparent avec pastilles intégrées de capacité ~~0.75 cLl~~ 0,75 L

Oxymètre NomaSense (par exemple).

2.1.3. Modes opératoires

2.1.3.1. Capacité antioxydante (test DPPH)

Solution de tanins œnologiques à 0,15 g/L : dissoudre 37,5 mg de tanins œnologiques dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5). Une dilution de

la solution de tanins œnologiques peut être nécessaire si la mesure de l'absorbance s'avère supérieure à 1 unité (dans ce cas, la dilution doit être prise en compte dans le calcul).

Solution de Trolox à 1 mM : dissoudre 125 g de Trolox dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Gamme d'étalonnage : dissoudre 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mL de solution de Trolox à 1 mM dans 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 0,9 mL de solution de vin modèle. Ces quantités correspondent respectivement à des concentrations finales de Trolox de 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mM.

Solution de DPPH à $6 \cdot 10^{-5}$ M : dissoudre 2,36 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. La solution doit être fraîchement préparée.

2.1.3.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Solution de tanins œnologiques à 1 g/L : dissoudre 0,75 g de tanins œnologiques dans 750 mL de solution de vin modèle.

Solution de vin modèle : dissoudre 4 g d'acide tartrique, 2,25 mg de chlorure de fer (III) hexahydraté et 0,225 mg de sulfate de cuivre (II) pentahydraté dans 90 mL d'éthanol et 660 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 3,5.

2.1.4. Essais

2.1.4.1. Capacité antioxydante

Mesurer un blanc contenant uniquement le réactif DPPH (BR) à 515 nm en plaçant 190 µL de solution de DPPH (1.3.1) dans chacun des puits de la plaque. Ajouter ensuite 10 µL de solution de tanins œnologiques (échantillons), d'eau distillée (blanc) ou de solution de la gamme d'étalonnage de Trolox (étalons) dans les puits et mesurer (SM) à 515 nm après 30 min.

Un exemple de remplissage de la plaque est présenté en figure 2.

La formule à appliquer pour le calcul de la capacité antioxydante est la suivante :

où « a » et « b » correspondent respectivement à la pente et à la constante de la courbe d'étalonnage du Trolox. Absorbance = f ([Trolox]) → Absorbance = ax + b

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une capacité antioxydante, et plus concrètement présenter une teneur supérieure à 600 ± 50 mg d'équivalent Trolox par gramme de tanins (extraits commerciaux).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
B	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
C	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
D	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
E	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
F	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
G	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
H	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11

T = Trolox OT = Oenological Tannins

Figure 7. Exemple de plaque de 96 puits

2.1.4.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Saturer la solution de vin modèle avec 8 mg/L d'oxygène en réalisant un barbotage d'air pendant 10 min à 20-25 °C. Ajouter ensuite les tanins œnologiques à la solution de vin modèle dans les bouteilles remplies à 0,75 cL. Fermer hermétiquement les bouteilles et agiter pour obtenir une parfaite homogénéisation.

1. Mesurer l'oxygène consommé tous les deux jours en commençant 1 h après le remplissage des bouteilles.
2. Pour déterminer le taux de consommation d'oxygène, suivre la procédure indiquée en figure 2 :

- représenter la consommation d'oxygène en fonction du temps,
- représenter ensuite l'inverse de la consommation d'oxygène en fonction de l'inverse du temps,

- le taux de consommation d'oxygène correspond à l'inverse du coefficient de pente :

OCR mg de O_2 par L consommé par jour et par g de tanins = 1/A, A étant le coefficient de pente

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une aptitude à consommer directement l'oxygène, et plus concrètement être capables de consommer au moins 0,50 ± 0,05 mg de O_2 par litre, par jour et par gramme de tanins (extraits commerciaux).

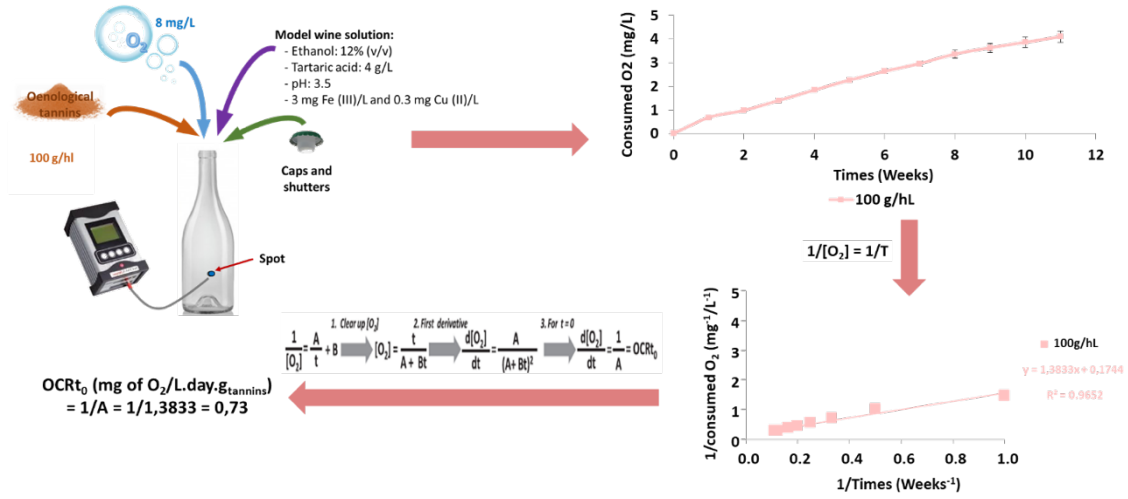


Figure 8. Procédure pour déterminer le taux de consommation d'oxygène

2.2.Aptitude antioxydasique

2.2.1. Principe

Détermination de l'aptitude antioxydasique des ellagitanins à contribuer à la protection antioxydasique par rapport à l'activité laccase des composés du moût et du vin.

2.2.2. Produits

Éthanol à 96 % vol, N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Acétate de sodium : MM = 82,03, N° CAS 6131-90-4

Syringaldazine (4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzaldéhyde azine) : MM = 360,36 , N°CAS: 14414-32-5

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), N° CAS 25249-54-1

Moût botrytisé avec une activité laccase

Eau distillée (qualité CLHP)

2.2.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 2 g/L : dissoudre 200 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution tampon à 8,2 g/L : dissoudre 410 mg d'acétate de sodium dans 50 mL d'eau distillée.

Solution de syringaldazine à 0,06 g/L : dissoudre 30 mg de syringaldazine dans 500 mL d'éthanol.

2.2.4. Essais

1. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de tanins œnologiques dans un tube, la solution obtenue correspondant à l'échantillon.
2. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de vin modèle dans un tube, la solution obtenue correspondant au témoin.
3. Après (exactement) 4 minutes, ajouter 0,8 g de PVPP dans chacun des tubes (échantillon et témoin), puis agiter et centrifuger pendant 10 minutes à 8500 tr/minute.
4. Prélever 1 mL du surnageant (aussi bien de l'échantillon que du témoin) dans 1,4 mL de solution tampon et 0,6 mL de solution de syringaldazine. Placer le mélange dans une cuvette en plastique de spectrophotomètre (trajet optique de 10 mm).
5. Mesurer l'absorbance à 530 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (temps de référence mesuré à 0 minute inclus).

6. Déterminer ensuite l'activité laccase et l'activité laccase résiduelle au moyen des équations suivantes et de la figure 3 :

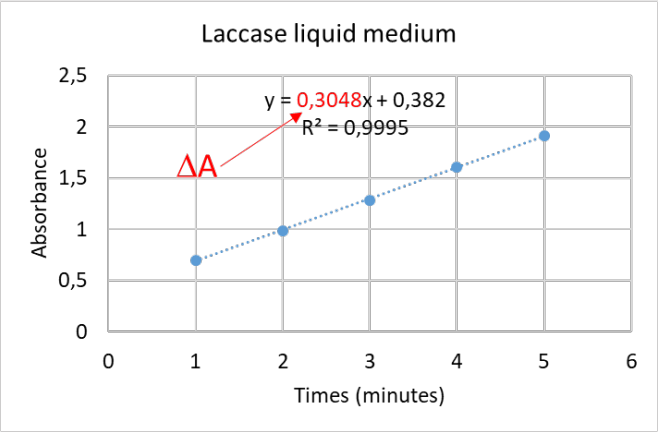


Figure 9. Exemple de détermination de

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une aptitude antioxydasique, et plus concrètement être capables de réduire l'activité laccase résiduelle d'au moins 40 %. Cette valeur est valide pour les moûts et les vins contenant moins de 5 UL (unités laccase).

2.3.Stabilisation de la couleur

2.3.1. Principe

Détermination des propriétés de stabilisation de la couleur des ellagitanins promouvant l'expression, la stabilisation et la préservation de la couleur dans le moût et le vin rouges.

2.3.2. Produits

Éthanol à 96 % vol., N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Malvidine-3-*O*-glucoside : MM = 528,87, N° CAS 18470-06-9

2.3.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 0,8 g/L : dissoudre 80 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution de malvidine-3-*O*-glucoside à 0,1 g/L : dissoudre 10 mg de malvidine-3-*O*-glucoside dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

2.3.4. Essais

1. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de vin modèle dans tube cônique à bouchon de 2 mL -noté tube- et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « T_0 ».

2. Placer 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside et 0,75 mL de solution de vin modèle dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « M ».

3. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « T_M ».

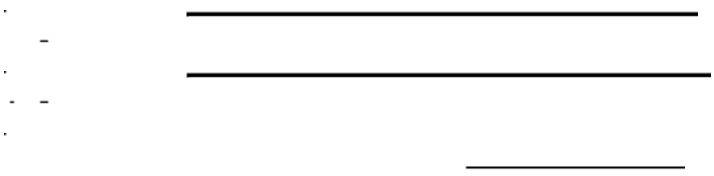
4. Après 7 jours, mesurer l'absorbance des trois tubes (T_M, T_0 et M) à 450, 520, 570 et 630 nm.

5. Soustraire la valeur de l'absorbance de T_0 à celle de T_M pour obtenir l'absorbance en évitant les interférences dues à la couleur « naturelle » des tanins œnologiques.

$A(\dot{\ }\ ) - A(\dot{\ }\ ) = A(T)$

6. Déterminer ensuite les coordonnés CIELAB (L*, a* et b*) correspondant à la solution de tanins + malvidine-3-*O*-glucoside (T) et à la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) en utilisant le logiciel gratuit MSCV ou équivalent (https://www.unirioja.es/color/descargas.shtml).

Les formules à appliquer pour le calcul de l'indice de copigmentation sont les suivantes :



- .TS : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside contenant des tanins commerciaux (T) et une solution de couleur blanche pure (W).

- .CS : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) et une solution de couleur blanche pure (W).

Les coordonnées CIELAB d'une solution de couleur blanche pure sont : L* = 100,00, a* = 0,00 et b* = 0,00.

Dans tous les cas, les ellagitanins (ou tanins ellagiques) doivent présenter une aptitude à stabiliser la couleur, et plus concrètement présenter un indice de copigmentation supérieur à 10,0 ± 2 % après sept jours.

Remarque : des méthodes de dosage alternatives peuvent être utilisées à la place de toutes les méthodes décrites, à la condition d'avoir fait l'objet d'une validation interne.

3. Bibliographie

- Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J. et Smith, P. A., « Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis », *Australian Journal of Grape Wine Research*, 2006, vol. 12, p.39-49.

- Vignault, A., González-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Iturmendi, N., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution », *Food Chemistry*, 2018, vol. 268, p. 210-219.

- Vignault, A., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F.,

« Impact of enological tannins on laccase activity », *OENO One,* 2019, vol. 53, p. 27-38.

- Vignault, A., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F., « Recent advances of the OIV working group on oenological tannins in the study of the functionalities of oenological », *BIO Web of Conferences*, 2019, vol. 15, 02015.
- Vignault, A., Gombau, J., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Copigmentation of Malvidin-3-O-Monoglucoside by Oenological Tannins: Incidence on Wine Model Color in Function of Botanical Origin, pH and Ethanol Content », *Molecules*, 2019, vol. 24, p. 1-15.
- Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Oenological tannins to prevent Botrytis cinerea damage in grapes and musts: kinetics and electrophoresis characterization of laccase », *Food Chemistry,* 2020, vol. 316, 126334.
- Vignault, A., « Tanins œnologiques : caractéristiques, propriétés et fonctionnalités. Impact sur la qualité des vins », Thèse de doctorat, Université de Bordeaux et Universitat Rovira i Virgili, 2019.

TANINS ŒNOLOGIQUES

Monographies spécifiques sur les profisetinidines/ prorobitenidines

(OIV-OENO 675D-2022)

Les profisétinidines/prorobiténidines constituent une sous-classe des tanins condensés (ou proanthocyanidiques). Sont inclus dans cette sous-classe les tanins issus du quebracho et de *l'acacia spp*.

1. Méthode pour la détermination des affiliations aux sous-classes

1.1. Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

1.1.1. Principe

La présente méthode est conçue pour vérifier la présence de constituants caractéristiques des tanins condensés du sous-groupe profisétinidines/prorobiténidines et mesurer leur concentration totale. . Elle s'applique à des préparations de tanins œnologiques revendiquées pures et ne contenant donc pas des tanins de petites masses de familles ou sous familles (ou classes) différentes.

1.1.2. Réactifs, matériel et appareillage

1.1.2.1. Réactifs

(+)-catéchine n° CAS 154-23-4

Eau ultra-filtrée (résistivité : 18,3 MΩ.cm)

Eau (qualité CLHP)

Méthanol (qualité CLHP)

Acide formique (qualité CLHP)

1.1.2.2. Matériel

Fiole en verre borosilicaté de 100 mL

Filtre d'une porosité de 0,45 µm

Seringue en plastique de 1 mL

1.1.2.3. Appareillage

Balance technique d'une précision de ± 0,01 g

Balance analytique d'une précision de ± 0,1 mg

Verrerie volumétrique de classe A

Système de chromatographie avec détection par spectrométrie de masse composé de :

- pompe à gradient binaire ou quaternaire,
- injecteur équipé d'une boucle de 10 µL,
- détecteur spectrophotométrique à longueur d'onde fixe de 280 nm,
- colonne Eclipse Plus C-18 (par exemple) : 2,1 × 100 mm, à particules de 1,8 µm,
- source ionisation ESI-SIM (ElectroSprayIonisation-Single Ion Monitoring)
- détecteur du spectromètre de masse : quadrupôle-temps de vol (Q-TOF).

1.1.3. Préparation des échantillons et des étalons

Échantillons : peser environ 0,5 g de tanins œnologiques sur la balance analytique et noter le poids. Dissoudre les tanins œnologiques dans 100 mL d'eau ultra-filtrée dans une fiole en verre borosilicaté de 100 mL et mélanger soigneusement.

Préparation des solutions d'étalonnage: mettre 10 mg de (+)-catéchine en solution dans 50 mL d'eau ultra-filtrée, soit une concentration de 200 mg/L. Procéder ensuite à des dilutions dans de l'eau ultra-filtrée pour obtenir des concentrations de 5, 10, 20, 40, 60, 80 et 100 mg/L.

Solvant A : eau (qualité CLHP) contenant 0,1 % d'acide formique.

Solvant B : méthanol contenant 0,1 % d'acide formique.

1.1.4. Mode opératoire

Filtrer les solutions d'échantillon et étalon sur un filtre d'une porosité de 0,45 µm et les analyser par chromatographie dans les conditions suivantes données à titre d'exemple :

Volume d'injection : 10 µL de solution d'échantillon ou de solution étalon de (+)-catéchine

Détection à 280 nm

Composition du gradient d'élution (temps, % de solvant A) :

0 min, 99,0 % ; 0,5 min, 94,0 % ; 20 min, 50,0 % ; 25 min, 0,0 % ; 32 min, 94,0 % et 10 min pour l'équilibre

équilibre

Débit : 0,3 mL/min

Détection et quantification de constituants caractéristiques de tanins condensés du sous-groupe ou sous classe profisetinidines/prorobitenidines par balayage ESI-SIM et détection Q-Tof, par exemple

Tableau 1.exemple de formules chimiques et m/z des différentes profisetinidines/prorobitenidines (pour le quebracho).

Composés	**Formule chimique**	**m/z**
(+)-catéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	290.1
(-)-épicatéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	290.1
Dimers catéchine-fisetinidol	$C_{30}H_{26}O_{11}$	562.1
Trimers catéchine-fisetinidol	$C_{45}H_{38}O_{16}$	834.2
Tétramères catéchine-fisetinidol	$C_{60}H_{50}O_{21}$	1106.3

Tableau 2.exemple de Formules chimiques et m/z des différentes profisetinidines/prorobitenidines (pour l'acacia)

Composés	Formule chimique	m/z
(+)-catéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	290.1

(-)-épicatéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	290.1
(-)-épicatéchine-3-O-gallate	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442.4
Dimers fisetinidol-gallocatéchine	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.1
Dimers robinetinidol-catéchine	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.1
Chalcan-flavan dimers (gambiriin)	$C_{30}H_{28}O_{12}$	580.1
Trimers catéchine-fisetinidol-robinetinidol ou gallocatéchine-fisetinidol-fisetinidol	$C_{45}H_{58}O_{17}$	850.2
Trimers robinetinidol-robinetinidol-catéchine ou gallocatéchine-fisetinidol-robinetinidol	$C_{45}H_{38}O_{17}$	866.2

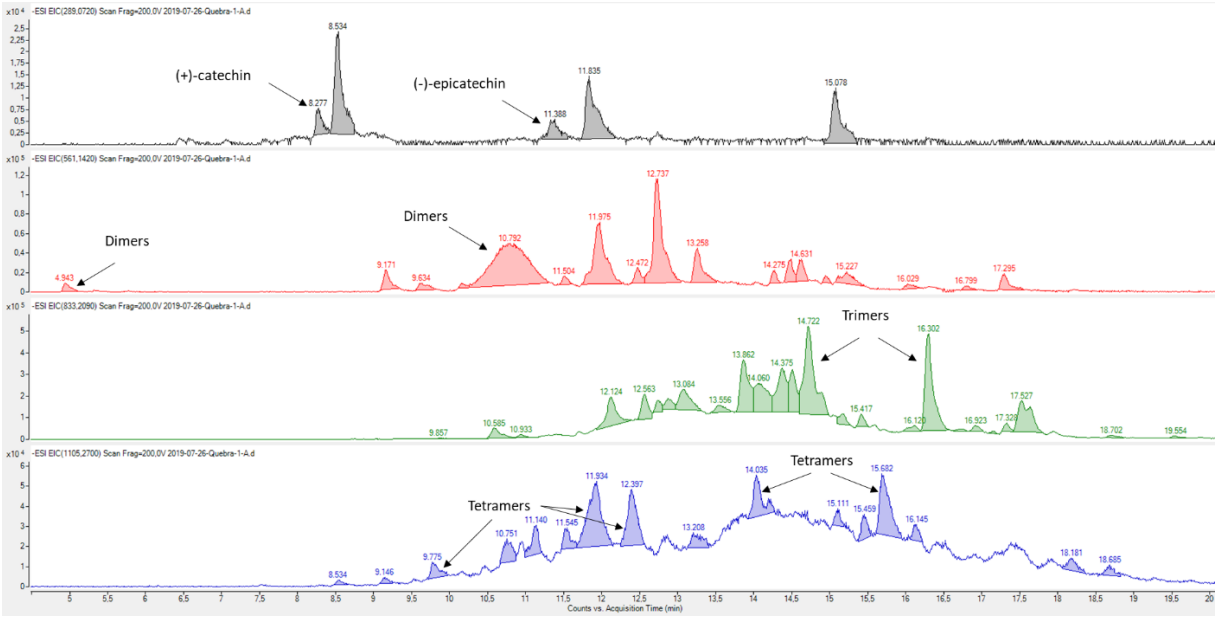


Figure 10. Exemple de balayage ESI-SIM du quebracho

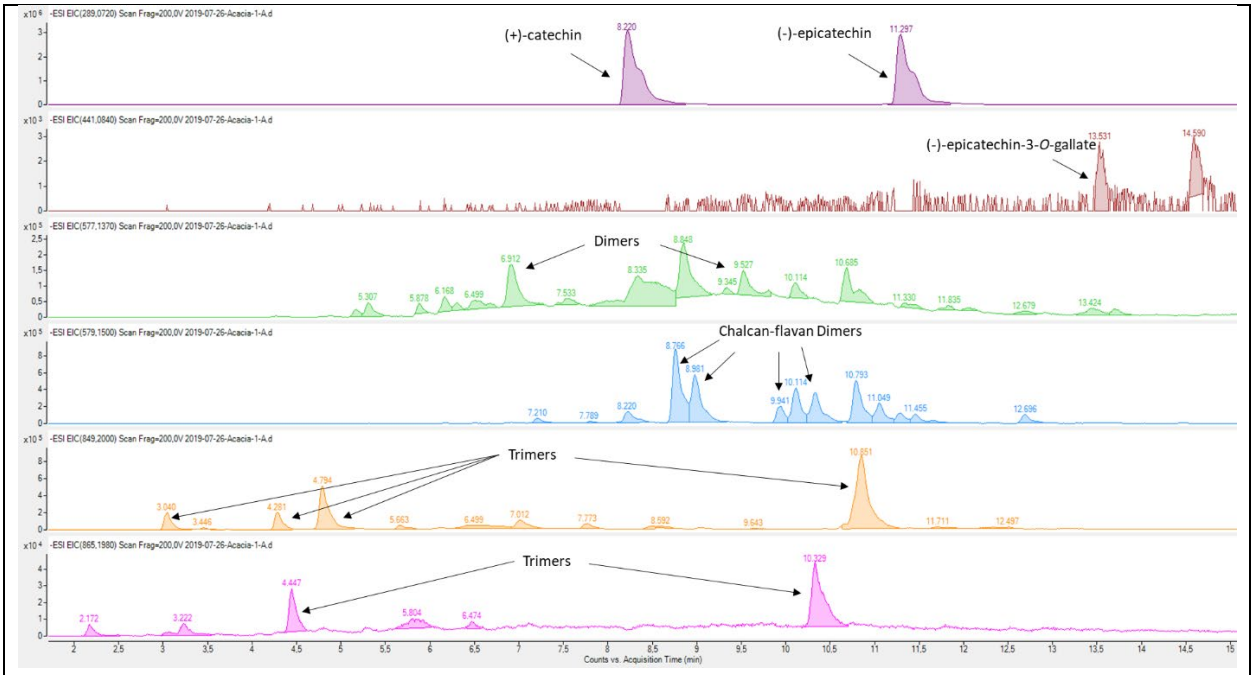


Figure 11. Exemple de balayage ESI-SIM de l'acacia

1.2. Conclusion

Un tanin œnologique est identifié comme une profisétinidine/prorobiténidine lorsque :

- **sa teneur en polyphénols totaux est supérieure à 65 % (méthode gravimétrique en annexe 1 de la monographie générale OIV-OENO 624-2022),**
- **sa teneur en profisetinidines/prorobitenidines évaluée par la méthode CLHP est supérieure à 20 mg (pour les tanins de quebracho) et 150 mg (pour les tanins d'acacia) équivalent (+)-catéchine par gramme de tanins œnologiques**

2. Méthode de mesure des propriétés et fonctionnalités

Les méthodes et critères de conformité ci-après ne sont applicables que lorsque la propriété/fonctionnalité est revendiquée sur la préparation de tannins.

2.1.Aptitude antioxydante

2.1.1. Principe

Détermination de l'aptitude antioxydante des profisétinidines/prorobiténidines à contribuer à la protection des moûts et des vins de l'oxydation.

2.1.2. Produits

2.1.2.1. Capacité antioxydante

DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) : MM = 394,32

Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) : MM = 250,29,

Méthanol à 99,9 % vol.

Lecteur de plaques de 96 puits (FLUOstar Omega - BMG Labtech, par exemple)

2.1.2.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Éthanol à 96 % vol., , N°CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, , N° CAS 87-69-4

Chlorure de fer (III) hexahydraté : MM = 270,30, N° CAS 7705-08-0

Sulfate de cuivre (II) pentahydraté : MM = 249,68, N° CAS 7758-98-7

Bouteilles en verre transparent avec pastilles intégrées de capacité 0,75 L

Oxymètre NomaSense, par exemple

2.1.3. Modes opératoires

2.1.3.1. Capacité antioxydante (test DPPH)

Solution de tanins œnologiques à 0,15 g/L : dissoudre 37,5 mg de tanins œnologiques dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5). Une dilution de la solution de tanins œnologiques peut être nécessaire si

la mesure de l'absorbance s'avère supérieure à 1 unité (dans ce cas, la dilution doit être prise en compte dans le calcul).

Solution de Trolox à 1 mM : dissoudre 125 g de Trolox dans 500 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Gamme d'étalonnage : dissoudre 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mL de solution de Trolox à 1mM dans 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 0,9 mL de solution de vin modèle. Ces quantités correspondent respectivement à des concentrations finales de Trolox de 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 mM.

Solution de DPPH à $6 \cdot 10^{-5}$ M : dissoudre 2,36 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. La solution doit être fraîchement préparée.

2.1.3.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Solution de tanins œnologiques à 1 g/L : dissoudre 0,75 g de tanins œnologiques dans 750 mL de solution de vin modèle.

Solution de vin modèle : dissoudre 4 g d'acide tartrique, 2,25 mg de chlorure de fer (III) hexahydraté et 0,225 mg de sulfate de cuivre (II) pentahydraté dans 90 mL d'éthanol et 660 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 3,5.

2.1.4. Essais

2.1.4.1. Capacité antioxydante

Mesurer un blanc contenant uniquement le réactif DPPH (BR) à 515 nm en plaçant 190 µL de solution de DPPH (1.3.1) dans chacun des puits de la plaque. Ajouter ensuite 10 µL de solution de tanins œnologiques (échantillons), d'eau distillée (blanc) ou de solution de la gamme d'étalonnage de Trolox (étalons) dans les puits et mesurer (SM) à 515 nm après 30 min.

Un exemple de remplissage de la plaque est présenté en figure 2.

La formule à appliquer pour le calcul de la capacité antioxydante est la suivante :

où « a » et « b » correspondent respectivement à la pente et à la constante de la courbe d'étalonnage du Trolox. Absorbance = f ([Trolox]) → Absorbance = ax + b

Dans tous les cas, les profisetinidines/prorobitenidines doivent présenter une capacité antioxydante, et plus concrètement présenter une teneur supérieure à 450 ± 50 mg d'équivalent Trolox par gramme de tanins (extraits commerciaux).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
B	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
C	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
D	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
E	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
F	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
G	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
H	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11

T = Trolox OT = Oenological Tannins

Figure 12. Exemple de plaque de 96 puits

2.1.4.2. Consommation directe d'oxygène (OCR)

Saturer la solution de vin modèle avec 8 mg/L d'oxygène en réalisant un barbotage d'air pendant 10 min à 20-25 °C. Ajouter ensuite les tanins œnologiques à la solution de vin modèle dans les bouteilles remplies à 0,75 L Fermer hermétiquement les bouteilles et agiter pour obtenir une parfaite homogénéisation.

1. Mesurer l'oxygène consommé tous les deux jours en commençant 1 h après le remplissage des bouteilles.
2. Pour déterminer le taux de consommation d'oxygène, suivre la procédure indiquée en **figure 2** :

- représenter la consommation d'oxygène en fonction du temps,
- représenter ensuite l'inverse de la consommation d'oxygène en fonction de l'inverse du temps,

- le taux de consommation d'oxygène correspond à l'inverse du coefficient de pente : OCR mg de O_2 par L consommé par jour et par g de tanins = 1/A, A étant le coefficient de pente

Dans tous les cas, les profisétinidines/prorobiténidines doivent présenter une aptitude à consommer directement l'oxygène, et plus concrètement être capables de consommer au moins 0,10 ± 0,05 mg de O_2 par litre, par jour et par gramme de tanins (extraits commerciaux).

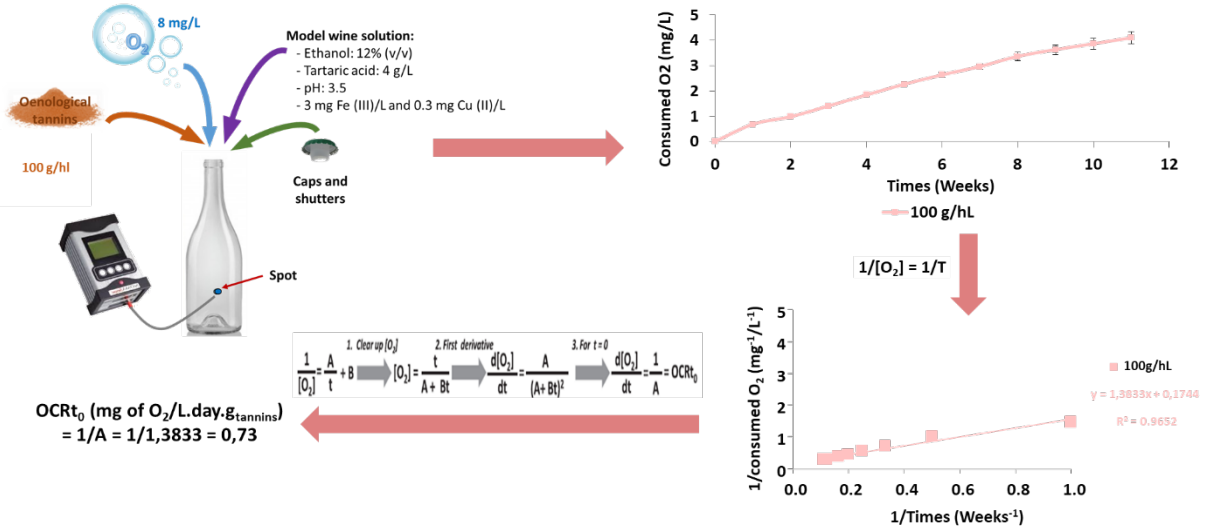


Figure 13. Procédure pour déterminer le taux de consommation d'oxygène

2.2.Aptitude antioxydasique

2.2.1. Principe

Détermination de l'aptitude antioxydasique des profisétinidines/prorobiténidines à contribuer à la protection antioxydasique par rapport à l'activité laccase des composés du moût et du vin.

2.2.2. Produits

Éthanol à 96 % vol., , N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Acétate de sodium : MM = 82,03, N° CAS 6131-90-4

Syringaldazine (4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzaldéhyde azine) :
MM = 360,36, , N°CAS: 14414-32-5

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), N° CAS 25249-54-1

Moût botrytisé avec une activité laccase

Eau distillée (qualité CLHP)

2.2.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 2 g/L : dissoudre 200 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution tampon à 8,2 g/L : dissoudre 410 mg d'acétate de sodium dans 50 mL d'eau distillée.

Solution de syringaldazine à 0,06 g/L : dissoudre 30 mg de syringaldazine dans 500 mL d'éthanol.

2.2.4. Essais

1. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de tanins œnologiques dans un tube, la solution obtenue correspondant à l'échantillon.
2. Ajouter 4 mL de moût botytrisé à 1 mL de solution de vin modèle dans un tube, la solution obtenue correspondant au témoin.
3. Après (exactement) 4 minutes, ajouter 0,8 g de PVPP dans chacun des tubes (échantillon et témoin), puis agiter et centrifuger pendant 10 minutes à 8500 tr/minute.
4. Prélever 1 mL du surnageant (aussi bien de l'échantillon que du témoin) dans 1,4 mL de solution tampon et 0,6 mL de solution de syringaldazine. Placer le mélange dans une cuvette en plastique de spectrophotomètre (trajet optique de 10 mm).
5. Mesurer l'absorbance à 530 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (temps de référence mesuré à 0 minute inclus).

6. Déterminer ensuite l'activité laccase et l'activité laccase résiduelle au moyen des équations suivantes et de la **figure 3** :

–	-

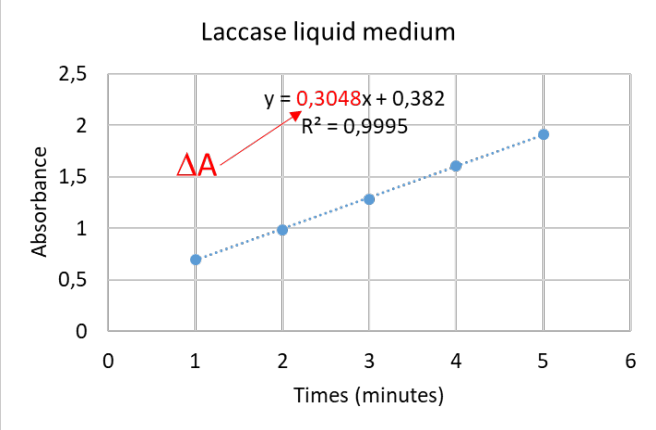


Figure 14. Exemple de détermination de _

Dans tous les cas, les profisétinidines/prorobiténidines doivent présenter une aptitude antioxydasique, et plus concrètement être capables de réduire l'activité laccase résiduelle d'au moins 40 %. Cette valeur est valide pour les moûts et les vins contenant moins de 5 UL (unités laccase).

2.3.Stabilisation de la couleur

2.3.1. Principe

Détermination des propriétés de stabilisation de la couleur des profisétinidines/prorobiténidines promouvant l'expression, la stabilisation et la préservation de la couleur dans le moût et le vin rouges.

2.3.2. Produits

Éthanol à 96 % vol., N° CAS 64-17-5

Acide tartrique : MM = 150,09, N° CAS 87-69-4

Malvidine-3-*O*-glucoside : MM = 528,87, N° CAS 18470-06-9

2.3.3. Mode opératoire

Solution de tanins œnologiques à 0,8 g/L : dissoudre 80 mg de tanins œnologiques dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

Solution de malvidine-3-*O*-glucoside à 0,1 g/L : dissoudre 10 mg de malvidine-3-*O*-glucoside dans 100 mL de solution de vin modèle (eau distillée, 12 % vol. d'éthanol, 4 g/L d'acide tartrique et pH ajusté à 3,5).

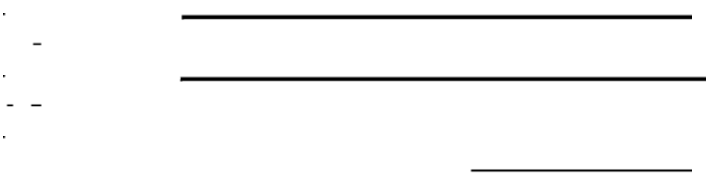
2.3.4. Essais

1. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de vin modèle dans un tube cônique à bouchon de 2 mL -noté tube- et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « ».
2. Placer 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside et 0,75 mL de solution de vin modèle dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « M ».
3. Placer 0,75 mL de solution de tanins œnologiques et 0,75 mL de solution de malvidine-3-*O*-glucoside dans un tube et le maintenir à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce tube est désigné « ».
4. Après 7 jours, mesurer l'absorbance des trois tubes (, et M) à 450, 520, 570 et 630 nm.
5. Soustraire la valeur de l'absorbance de T_0 à celle de T_M pour obtenir l'absorbance en évitant les interférences dues à la couleur « naturelle » des tanins œnologiques.

A( ) - A( ) = A(T)

6. Déterminer ensuite les coordonnés CIELAB (L*, a* et b*) correspondant à la solution de tanins + malvidine-3-*O*-glucoside (T) et à la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) en utilisant le logiciel gratuit MSCV ou équivalent (https://www.unirioja.es/color/descargas.shtml).

Les formules à appliquer pour le calcul de l'indice de copigmentation sont les suivantes :



.TS : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside contenant des tanins commerciaux (T) et une solution de couleur blanche pure (W).

.CS : différence de couleur totale entre la solution de malvidine-3-*O*-glucoside (M) et une solution de couleur blanche pure (W).

Les coordonnées CIELAB d'une solution de couleur blanche pure sont : L* = 100,00, a* = 0,00 et b* = 0,00.

Dans tous les cas, les profisétinidines/prorobiténidines doivent présenter une aptitude à stabiliser la couleur, et plus concrètement présenter un indice de copigmentation supérieur à 3,0 0,5 % après sept jours.

Remarque : des méthodes de dosage alternatives peuvent être utilisées à la place de toutes les méthodes décrites, à la condition d'avoir fait l'objet d'une validation interne.

3. Bibliographie

- Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J. et Smith, P. A., « Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis », *Australian Journal of Grape Wine Research*, 2006, vol. 12, p. 39-49.
- Vignault, A., González-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Iturmendi, N., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36

commercial oenological tannins in a model wine solution », *Food Chemistry*, 2018, vol. 268, p. 210-219.

- Vignault, A., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F., « Impact of enological tannins on laccase activity », *OENO One,* 2019, vol. 53, p. 27-38.
- Vignault, A., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Teissedre, P.-L. et Zamora, F., « Recent advances of the OIV working group on oenological tannins in the study of the functionalities of oenological », *BIO Web of Conferences*, 2019, vol. 15, 02015.
- Vignault, A., Gombau, J., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Copigmentation of Malvidin-3-O-Monoglucoside by Oenological Tannins: Incidence on Wine Model Color in Function of Botanical Origin, pH and Ethanol Content », *Molecules*, 2019, vol. 24, p. 1-15.
- Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F. et Teissedre, P.-L., « Oenological tannins to prevent Botrytis cinerea damage in grapes and musts: kinetics and electrophoresis characterization of laccase », *Food Chemistry,* 2020, vol. 316, 126334.
- Vignault, A., « Tanins œnologiques : caractéristiques, propriétés et fonctionnalités. Impact sur la qualité des vins », Thèse de doctorat, Université de Bordeaux et Universitat Rovira i Virgili, 2019.

OXYGENE
O_2 = 32,0
N° SIN: 948
N°CAS = 7727-44-7
(Oeno 32/2004)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Gaz utilisé pour les opérations d'hyperoxygénation du moût ou d'oxygénation du vin, il est aussi utilisé pur ou en mélange avec de l'azote (air reconstitué) au cours de la fermentation alcoolique (remontages).

2. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit mentionner la nature du gaz et faire référence à sa composition et sa pureté, les conditions de sécurité doivent aussi être indiquées sur les emballages.

3. CARACTERES

Gaz incolore, inodore et sans saveur. Non inflammable, il entretient la combustion. Le poids d'un litre d'oxygène dans les conditions normales sous la pression de 760 mm de mercure et à 20°C est de 1,429 g.

Un volume d'eau dissout 0,0325 volume d'oxygène (44 mg/l), cette solubilité est de 0,049 ml à 0 °C (70 mg/l) et un volume d'alcool dissout 0,1428 volume d'oxygène.

Il est donc possible de dissoudre 44 ml d'oxygène à 20 °C dans un litre de vin dont le titre alcoométrique est de 12 % vol.
En association avec l'azote (air) la solubilité maximum de l'oxygène est de 10,27 ml/l dans l'eau à 20 °C soit environ 13,9 ml dans un litre de vin dont le titre alcoométrique est de 12 % vol.

4. ESSAIS

La pureté globale de l'oxygène employé en œnologie doit être supérieure ou égale à 99 % en volume.

Avant toute mesure, il convient de laisser échapper le gaz pendant quelques instants pour purger les canalisations.

4.1 Dosages chromatographiques

La recherche et le dosage des gaz : Azote, oxyde de carbone (moins de 10 µl/l), argon, dioxyde de carbone (moins de 300 µl/l), etc., sont obtenus rapidement par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.

4.2 Dosage de l`oxygène

Placer une quantité suffisante de solution d'hydroxyde d'ammonium et de chlorure d'ammonium, préparée en mélangeant en volumes égaux de l'eau et de l'hydroxyde d'ammonium et en saturant avec du chlorure d'ammonium à la température ambiante, dans un appareil composé
- d'une burette calibrée de 100 ml munie d'un robinet bi-directionnel,
- d'une pipette d'absorption de gaz, et
- d'un vase de niveau, de la capacité appropriée et de toutes les connections pour relier cet ensemble.

Remplir la pipette d'absorption de gaz de tournure de cuivre, de fil ou treillis métallique ou de tout autre système approprié.
Éliminer toutes les bulles de gaz du liquide dans l'appareillage d'essai. Utiliser la solution d'essai à deux ou trois reprises sans effectuer de mesure.

Remplir la burette calibrée, toutes les connections, les deux ouvertures du robinet, et le tube de prise de liquide.
Entraîner 100,0 ml d'oxygène dans la burette en abaissant le vase de niveau.
Ouvrir le robinet vers la pipette d'absorption, et forcer l'oxygène à pénétrer dans la pipette d'absorption en soulevant le vase de niveau. Agiter la pipette pour favoriser le contact intime du liquide, du gaz, et du cuivre.
Continuer l'agitation jusqu'à ce qu'aucune autre diminution en volume ne se produise.
Entraîner le gaz résiduel de nouveau dans la burette calibrée, et mesurer son volume:
Il ne doit pas rester un volume de gaz supérieur à 1,0 ml.

Remarque : en solution l'oxygène peut être dosé par polarographie.

5. CONDITIONNEMENT

L'oxygène est livré en cylindres d'acier de forte résistance, peints en blanc, munis de robinet à pointeau. La résistance de ces cylindres doit être contrôlée périodiquement.

PERLITE
N° CAS 93763-70-3
Perlite expansée
(Oeno 10/2003)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La perlite est une roche vitreuse d'origine volcanique, appartenant au groupe des rhyolithes. De composition analogue à celle du verre, elle est constituée de silicate d'aluminium contenant 1 à 2 p. 100 d'eau chimiquement liée.

Pour être utilisée en œnologie, cette roche doit être séchée à 150 °C, broyée puis subir une « expansion » par préchauffage entre 200 et 400 °C, suivi d'une projection de la perlite dans une flamme à température élevée de 800 °C à 1100 °C, qui provoque un gonflement de la perlite, l'accroissement du volume pouvant atteindre 60 fois celui du grain initial.

Elle se présente sous forme d'une poudre blanche dont la granulométrie finale est obtenue par un broyage après l'expansion.

C'est un adjuvant de filtration des vins.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté et les conditions de conservation.

3. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

3.1 Odeur et goût

La perlite ne doit communiquer ni odeur ni goût étranger au vin. Placer 2,5 g de perlite dans un litre de vin. Agiter. Laisser reposer 24 heures. Déguster par rapport au même vin n'ayant pas reçu de perlite.

3.2 Perte à la dessiccation

Placer dans une capsule environ 5 g de perlite. Porter à l'étuve à 103 $\pm$ 2 °C. Après deux heures la perte de poids ne doit pas être supérieure à 1 p. 100.

3.3 Perte à la calcination

Porter le résidu sec obtenu au point 3.2 dans un four à 550 °C ; la perte de poids ne doit pas dépasser 3 p. 100.

3.4 Mesure du pH.

Dans un récipient de 250 ml, placer 10 g environ de perlite puis verser lentement, en agitant manuellement, 100 ml d'eau pour mouiller le produit et réaliser une suspension homogène. Agiter de temps en temps manuellement ou à l'aide d'un agitateur magnétique. Après 10 minutes, laisser reposer la suspension et mesurer le pH. La perlite expansée a un pH compris entre 7,5 et 10.

3.5 Produits solubles dans les acides dilués

Traiter à l'ébullition 10 g de perlite séchée par 20 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 100 ml d'eau. Recueillir la perlite sur un filtre sans cendres et laver le résidu avec 100 ml d'eau distillée. Après dessiccation à 100-105 °C et incinération, séparé du filtre le résidu insoluble devra peser au moins 9,8 g soit 98 p. 100 du produit sec.

3.6 Préparation de la solution pour essais

Dans un flacon de 500 ml, pouvant être hermétiquement bouché, placer 200 ml d'acide citrique à 5 g par litre amené à pH 3 (R) et 10 g de perlite. Placer sur un agitateur et agiter pendant 1 heure à une température de 20 $\pm$ 2 °C. Laisser reposer puis filtrer en éliminant les 50 premiers ml de filtrat. Recueillir au moins 100 ml de liquide clair.

3.7 Fer

Sur la solution pour essais préparée selon le point 3.6, procéder au dosage du fer selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur en fer doit être inférieure à 300 mg/kg .

3.8 Plomb

Sur la solution pour essais préparée selon le point 3.6, procéder au dosage du plomb selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

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

3.9 Mercure

Sur la solution pour essais préparée selon le point 3.6, doser le mercure selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

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

3.10 Arsenic

Sur 4 ml de la solution pour essais préparée selon le point 3.6, doser l'arsenic selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

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

3.11 Cadmium

Sur la solution pour essais préparée selon le point 3.6, doser le cadmium selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international.

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

4. CONSERVATION

La perlite doit être conservée dans des endroits secs bien ventilés dans des sacs étanches, dans des locaux tempérés.

COPOLYMERES ADSORBANTS DE POLYVINYLIMIDAZOLE/POLYVINYLPYRROLIDONE (PVI/PVP)

N° C.A.S.: 87865-40-5
Oeno 262/2014
Oeno 605/2017

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les copolymères adsorbants de PVI/PVP sont des poudres insolubles et légèrement hygroscopiques. Ils sont produits par polymérisation « popcorn » de N-vinylimidazole (N° CAS 1072-63-5) et de N-vinyl-2-pyrrolidone (N° CAS 88-12-0), dans une proportion de 9 :1. Le N, N´-divinylimidazolidin-2-one (N° CAS 13811-50) est utilisé comme agent réticulant à hauteur de moins de 2 % de la masse totale des monomères.

Les copolymères adsorbants de PVI/PVP sont ajoutés au moût ou au vin conformément aux fiches décrites dans le Code des pratiques œnologiques de l'OIV à des doses inférieures à 500 mg/l.

Les copolymères adsorbants de PVI/PVP peuvent être ajoutés au moût ou au vin afin de prévenir les défauts causés par des teneurs en métaux trop élevées ou pour réduire les concentrations indésirablement élevées en métaux.

Le moût ou le vin doivent être filtrés à travers un media filtrant dont le diamètre des pores ne dépasse pas 3 microns et avec une pression de filtration n'excédant pas 0,8 bars.

2. SYNONYMES

Terpolymère de 1-vinylimidazole,1-vinylpyrrolidone et 1,3-divinyl imidazolidinone.

Copolymère à réticulation transversale de vinylimidazole/vinylpyrrolidone.

3. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit mentionner que le copolymère adsorbant de PVI/PVP est à usage oenologique. Les conditions de conservation et de sécurité doivent également être indiquées.
L'étiquetage doit mentionner une date limite d'utilisation de 3 ans.

4. CARACTERES

Poudre de couleur blanche à jaunâtre.
Le copolymère adsorbant de PVI/PVP est insoluble dans pratiquement tous les solvants courants. Il est donc impossible de mesurer le poids moléculaire.

5. ESSAIS

5.1 Perte à la dessiccation

Tarer une capsule en métal de 50 mm de diamètre. Placer entre 0,8 et 1,4 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP, préalablement mélangé et pesé de manière précise dans le récipient. Peser l'ensemble dans une balance fermée. Sécher dans une étuve à 140°C ± 5°C pendant 1 heure. Laisser refroidir dans un dessiccateur. Peser.
La perte à la dessiccation doit être inférieure à 5%.

5.2 Cendres

Chauffer un creuset de porcelaine jusqu'au rouge sombre, laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. Placer 1,5 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP dans le creuset et incinérer à masse constante dans un four à moufle à 800°C ± 25°C, en laissant le creuset refroidir dans un dessiccateur après chaque incinération, la durée de la première incinération étant de 6 heures. Le cas échéant procéder à une pré-incinération de l'échantillon.
Le poids des cendres doit être inférieur à 0,02 %.

5.3 Préparation de la solution pour essais:

Après la pesée des cendres, les dissoudre dans 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau distillée. Chauffer pour activer la dissolution. Porter à 20 ml avec de l'eau distillée. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0,075 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP.

5.4 Zinc
Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le zinc selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en zinc doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.5 Fer
Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le fer selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en fer doit être inférieure à 5 mg/kg.

5.6 Cuivre
Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le cuivre selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en cuivre doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.7 Plomb
Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le plomb selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

5.8 Cadmium
Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le cadmium selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.9 Arsenic
Ne pas utiliser la solution pour essais préparée au point 5.3.
Doser l'arsenic selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 2 mg/kg.

5.10 Mercure
Ne pas utiliser la solution pour essais préparée au point 5.3.
Doser le mercure selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.11 Impuretés organiques
Procéder à la détermination des impuretés organiques selon a méthode décrite à l'Annexe 1.
Les limites d'impuretés organiques doivent être les suivantes:

- La teneur en Vinylpyrrolidone doit être inférieure à 5 mg/kg
- La teneur en Vinylimidazole doit être inférieure à 10 mg/kg
- La teneur en Divinylimidazolidinone doit être inférieure à 2 mg/kg
- La teneur en Pyrrolidone doit être inférieure à 50 mg/kg
- La teneur en Imidazole doit être inférieure à 50 mg/kg

5.12 Mesure de l'azote total

Placer environ 450 mg du copolymère adsorbant PVI/PVP (prise d'essai *m* en mg) dans un matras à minéralisation, ajouter 10 g de Catalyseur Missouri[28], et 3 perles de verre. Laver toutes les particules qui adhèrent au col du matras avec une faible quantité d'acide sulfurique (R). Ajouter en tout 20 ml d'acide sulfurique (R), en le faisant couler le long des parois du matras et mélanger le contenu par rotation. Continuer l'opération d'analyse selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en azote total doit être comprise entre 26,0 et 29,0% par rapport au poids sec.

5.13 Solubilité en milieu aqueux

Placer 10 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP dans une fiole jaugée de 200 ml contenant 100 ml d'eau. Agiter le flacon et laisser reposer le contenu pendant 24 heures. Filtrer sur une membrane filtrante de 2,5 µm de diamètre de pores, puis sur une membrane filtrante de 0,8 µm de diamètre de pores. Le résidu sec restant après évaporation du filtrat sur un bain d'eau doit être inférieur à 0,5%.

5.14 Solubilité dans l'acide et dans l'alcool

Introduire 1 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP dans un flacon contenant 500 ml du mélange suivant:

Acide acétique	3 g
Ethanol	10 ml
Eau	100 ml

Laisser reposer 24 heures. Filtrer sur une membrane filtrante de 2,5 µm de porosité, puis sur une membrane filtrante de 0,8 µm de diamètre de pores. Concentrer le filtrat sur un bain d'eau. Finir l'évaporation sur un bain d'eau dans une capsule de silice tarée de 70mm de diamètre. Le résidu sec restant

[28] Catalyseur Missouri (= 49,9 % K_2SO_4 + 49,8 % Na_2SO_4 + 0,3 % $CuSO_4$), Merck, Darmstadt ou équivalent

après évaporation doit être inférieur à 1%, en tenant compte de tout le résidu de l'évaporation des 500 ml du mélange acide acétique-éthanol-eau.

5.15 Détermination et limites des monomères dans les moûts et les vins

5.15.1 Méthode analytique

Procéder à la détermination selon la méthode décrite en annexe 2

5.15.2 Limites des monomères dans le vin[29]

La teneur en Vinylpyrrolidone doit être inférieure à 10 µg/l
La teneur en Vinylimidazole doit être inférieure à 10 µg/l
La teneur en Pyrrolidone doit être inférieure à 25 µg/l
La teneur en Imidazole doit être inférieure à 150 µg/l

6. CONSERVATION

Le copolymère adsorbant de PVI/PVP doit être conservé dans un endroit frais. Les récipients doivent être secs et fermés hermétiquement.

[29] Le calcul de la limite supérieure a été basée sur les résultats obtenus sur des tests de migration = la dose recommandée de 0,5 g / l, le temps maximum d'application de 48 heures et une température de traitement de 20°C, multipliée par un facteur de 2.
Dans des conditions acides (faibles valeurs de pH) la Divinylimidazolidinone (Divinyl éthylène-urée) n'est pas stable et se dégrade donc en Imidazolidinone et vinylalcool . En outre l'imidazolidinone se dégrade en urée et en éthylène glycol. Le vinylalcool est en équilibre chimique avec l'acétaldéhyde.
L'imidazolidinone a été inclus dans l'évaluation toxicologique ainsi que l'acétaldéhyde, l'urée et l'éthylène glycol.

Annexe 1

Détermination par chromatographie gazeuse des monomères constitutifs et/ou impuretés susceptibles d'être contenus dans des copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol (vinylimidazol, vinylpyrrolidone, pyrrolidone, divinyléthylène-urée et imidazol)

1. Principe

Recherche et dosage des monomères constitutifs et/ou impuretés susceptibles d'être contenus dans des copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol (vinylimidazol, vinylpyrrolidone, pyrrolidone, divinyléthylène-urée et imidazol).

L'analyse s'effectue par chromatographie en phase gazeuse capillaire en utilisant un détecteur spécifique des composés azotés (NSD). Les substances à analyser sont préalablement extraites du polymère par l'acétone.

2. Gamme des teneurs à déterminer

Vinylimidazol :	2-55 µg/g
Vinylpyrrolidone :	2-50 µg/g
Pyrrolidone :	2-70 µg/g
Divinyléthylène-urée :	2-33 µg/g
Imidazol :	2-50 µg/g

3. Réactifs, matériel de référence

3.1 Copolymères vinylpyrrolidone-vinylimidazol ;

3.2 Vinylimidazol, M($C_5H_6N_2$) = 94,12 g/mol
pureté > 99 % (CG), par ex. Fluka, article n° 95005
(R : 22-34, S : 26-36/37/39-45)

3.3 Vinylpyrrolidone (*1-vinyl-2-pyrrolidone*), M(C_6H_9NO) = 111,14 g/mol
pureté = 99,8 % (CG), par ex. Fluka, article n° 95060
(R : 20/21/22-36/37/38-40, S : 26-36/37/39)

3.4 Pyrrolidone, (*2-pyrrolidone*), M(C_4H_7NO) = 85,11 g/mol
pureté > 99 % (CG), par ex. Fluka, article n° 83300
(R : 36/37/38, S : 26-36)

3.5 Divinyléthylène-urée (*N,N-divinylimidazolidone*), M($C_7H_{10}N_2O$) = 138,17 g/mol
pureté ≥ 99 % (CG), matériel de référence BASF
(R : 36/38-40, S : 26-36/37)

3.6 Imidazol, ($C_3H_4N_2$) = 68,08 g/mol
pureté > 99,5 % (CG), par ex. Fluka, article n° 56748
(R : 22-34, S : 26-36/37/39-45)

3.7 Benzonitrile,
pureté > 99 % (CG), par ex. Merck-Schuchardt, article n° 801800
(R : 10-35, S : 23-26-45)

3.8 Acétone,
pureté ≥ 99 % (CG), par ex. Fluka, article n° 00585
(R: 11, S : 9-16-23-33)

4. Appareillage

4.1 Chromatographe en phase gazeuse avec échantillonneur automatique, injecteur split, détecteur spécifique des composés azotés (NSD).

4.2 Colonne capillaire en silice fondue, avec un film de polyéthylène glycol, (par ex. DB-Wax, J&W Scientific)
Longueur : 30 m
Diamètre intérieur : 0,25 mm
Epaisseur du film : 0,5 µm

4.3 Système informatique d'acquisition des données

4.4 Balance analytique sensible à 0,1 mg

4.5 Verrerie et appareils de laboratoire courants

4.6 Agitateur rotatif pouvant recevoir des flacons de petite capacité par ex. 50 ml.

5. Solutions

5.1 Solution de l'étalon interne

Benzonitrile, à 250 µg/ml dans l'acétone (3.8)

5.2 Solution mère de calibrage

Préparer une solution mère de calibrage de concentrations différentes dans l'acétone (3.8) contenant du vinylimidazol, de la vinylpyrrolidone, de la pyrrolidone, de ladivinyléthylène-urée et de l'imidazol à la dose de 250 mg/l à 1000 mg/l.

5.3 Solutions de calibrage

Préparer au moins deux solutions de calibrage de concentrations différentes dans l'acétone (3.8). Chaque solution doit contenir une quantité appropriée d'étalon interne ainsi que du vinylimidazol, de la vinylpyrrolidone, de la pyrrolidone, de la divinyléthylène-urée et de l'imidazol de telle sorte que les points de calibrage englobent la valeur en cours de mesure.

A titre d'exemple

4 µl-200 µl de solution mère (5.2) + 24 ml d'acétone (3.8)+ 1 ml de solution d'étalon interne (5.1)

6. Conditions chromatographiques à titre d'exemple

Températures :	
Injecteur :	220 °C
Four :	160 °C
Puis programmation à raison de 5 °C/min jusqu'à 210 °C	
Isotherme final :	210 °C, 7 min
Détecteur (NSD) :	250 °C
Gaz vecteur :	hélium
Pression tête de colonne :	140 kPa (1,4 bar)
Split :	10 ml/min
Balayage du septum :	5 ml/min
Volume injecté :	1,0 µl

7. Vérification préalable du système analytique

7.1 Résolution

Préparer une solution de benzonitrile et de vinylimidazol (10 et 2 µg/ml dans l'acétone).
Injecter cette solution dans le chromatographe dans les conditions décrites au point 6
L'analyse est jugée satisfaisante lorsque la résolution des deux pics chromatographiques est au moins de 1,5 (R >1,5) : retour à la ligne de base entre les deux pics.

7.2 Sensibilité

Pour vérifier la sensibilité :
1 Effectuer une analyse préalable d'un échantillon (8.1) dans les conditions décrites au point 6
2 ajouter à l'échantillon 2 µg/g de divinyléthylène-urée puis refaire une analyse dans les conditions décrites au point 6
Si l'échantillon ne contient pas de divinyléthylène-urée Le système est adapté lorsque le pic de la divinyléthylène-urée rajoutée présente un rapport signal/bruit de 10 au minimum.
Si l'échantillon contenait de la divinyléthylène-urée on doit observer une augmentation nette du signal.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons

Peser env. 2 g d'échantillon avec une précision de 0,1 mg puis les mélanger à 1 ml de solution d'étalon interne (5.1) et 24 ml d'acétone (3.8). Ensuite, extraire l'échantillon pendant 4 h sur l'agitateur rotatif (4.6) puis analyser la solution surnageante dans les conditions décrites au point 6.
Pour les déterminations de routine, analyser chaque échantillon deux fois.

8.2 Chromatogrammes en phase gazeuse

Extrait par l'acétone d'un copolymère (fig. 1)
Extrait par l'acétone d'un copolymère supplémenté avec des analytes (Fig. 2)

9. Calcul

9.1 Facteur de calibrage

Facteur de calibrage de chromatographie gazeuse f(i) :

$$f(i) = \frac{\mathrm{A(i)_0} \times \mathrm{m(I.S.)_0}}{m(i)_0 \times A(I.S)._0}$$

avec :
$A(i)_0$ = surface du pic de l'analyte i dans le chromatogramme de la solution de calibrage (mVs)
$m(i)_0$ = masse initiale du produit de référence i dans la solution de calibrage [mg]
$A(I.S.)_0$ = surface du pic de l'étalon interne dans le chromatogramme de la solution de calibrage (mVs)
$m(I.S.)_0$ = masse initiale de l'étalon interne dans la solution de calibrage [mg]

La proportion massique w(i) de l'analyte i se calcule de la manière suivante :

$$w(i) = \frac{A(i) \times m(I.S.)}{A(I.S.) \times m(s) \times f'(i)}$$

avec :
w(i) = proportion massique de l'analyte i [µg/g]
A(i) = surface du pic de l'analyte i dans le chromatogramme de la solution d'échantillon (mVs)
A(I.S.) = surface du pic de l'étalon interne dans le chromatogramme de la solution d'échantillon (mVs)
m(I.S.) = masse initiale de l'étalon interne ajouté à l'échantillon [µg]
m(s) = masse initiale de l'échantillon [g]
f'(i) = facteur de calibrage moyen de chromatographie gazeuse

Pour les déterminations de routine, le résultat est arrondi à une valeur entière.

10. Caractéristiques de la méthode

10.1 Spécificité, sélectivité

Dans le chromatogramme, les pics sont identifiés d'après leur temps de rétention en comparaison avec le temps de rétention des solutions de substances pures (3.2 à 3.6) injectées dans les mêmes conditions.
Vérifier que les constituants de l'échantillon ont un temps de rétention différent de celui de l'étalon interne et que la résolution entre les pics est toujours supérieure à 1,5.

10.2 Linéarité

Lors du calibrage, les facteurs de calibrage ont été déterminés sur 6 niveaux de concentrations pour chaque analyte. Les courbes de calibrage sont des droites (cf. fig. 3-7) avec les coefficients de détermination suivants :

Vinylimidazol	R^2 = 0,9987
Vinylpyrrolidone	R^2 = 0,9999
Pyrrolidone	R^2 = 0,9956
Divinyléthylène-urée	R^2 = 0,9937
Imidazol	R^2 = 0,9982

10.3 Limite de détermination

Les mesures de calibrage permettent d'évaluer les limites de détermination suivantes :

Vinylimidazol :	2 µg/g
Vinylpyrrolidone :	2 µg/g
Pyrrolidone :	2 µg/g
Divinyléthylène-urée :	2 µg/g
Imidazol :	2 µg/g

10.4 Précision

Pour déterminer la précision dans des conditions répétitives, un échantillon de copolymère a été analysé 6 fois : (Tableau 1)

Tableau 1

		Vinylimidazol	Vinylpyrrolidone	Pyrrolidone	Divinyléthylène-urée	Imidazol
1. Détermination	[µg/g]	ndt*	ndtt**	4,1	ndtt	10,7
2. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	4,3	ndtt	10,8
3. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	4,2	ndtt	11,5
4. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	4,3	ndtt	11,8
5. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	3,9	ndtt	10,2
6. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	3,9	ndtt	10,8
Moyenne	[µg/g]	ndt	ndtt	4,1	ndtt	11,0
Ecart type	[µg/g]			0,2		0,6
Coef. de variation	%			4,8		5,1
imprécision mesure	[µg/g]			0,6		1,7
impréc. mesure rel.	%			14		15

*ndt = non déterminable
**ndtt= non détectable

Dans l'échantillon, la vinylpyrrolidone et la divinyléthylène-urée n'ont pas pu être détectées et le vinylimidazol n'a pas pu être quantifié.

10.4.1. Répétabilité

L'échantillon copolymère a été supplémenté avec tous les analytes puis analysé à 6 reprises. La précision dans des conditions de répétition peut être déduite des taux de répétition pour la vinylpyrrolidone, la divinyléthylène-urée et le vinylimidazol. (Tableau 2)

Tableau 2

		Vinylimidazol	Vinylpyrrolidone	Pyrrolidone	Divinyléthylène-urée	Imidazol
1. Détermination	[%]	102,3	112,4	97,0	103,3	90,7
2. Détermination	[%]	98,5	101,9	89,6	102,1	91,7
3. Détermination	[%]	111,8*	111,5	105,7	111,1	112,6 *
4. Détermination	[%]	102,7	103,3	91,9	104,8	94,5
5. Détermination	[%]	104,2	101,0	89,3	102,7	97,0
6. Détermination	[%]	100,4	104,9	90,4	110,3	95,4
Moyenne	[%]	101,6	105,8	94,0	105,7	93,9
Ecart type	[%]	2,2	4,9	6,4	3,9	2,6
Coef. de variation	[%]	2,2	4,7	6,8	3,7	2,8
imprécision mesure	[%]	6,6	14,8	19,2	11,8	7,8
impréc. mesure rel.	[%]	7	14	20	11	8

* = valeur aberrante selon Dixon

10.5 Taux de récupération d'ajouts

Le taux de récupération peut être calculé à partir du tableau 2,

Vinylimidazol :	101,6 %
Vinylpyrrolidone :	105,8 %
Pyrrolidone :	94,0 %
Divinyléthylène-urée :	105,7 %
Imidazol :	93,9 %

Remarque

Applicabilité à d'autres copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol

La méthode a été validée pour le Divergan HM. On peut partir du principe que la détermination est également valable pour d'autres copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol.

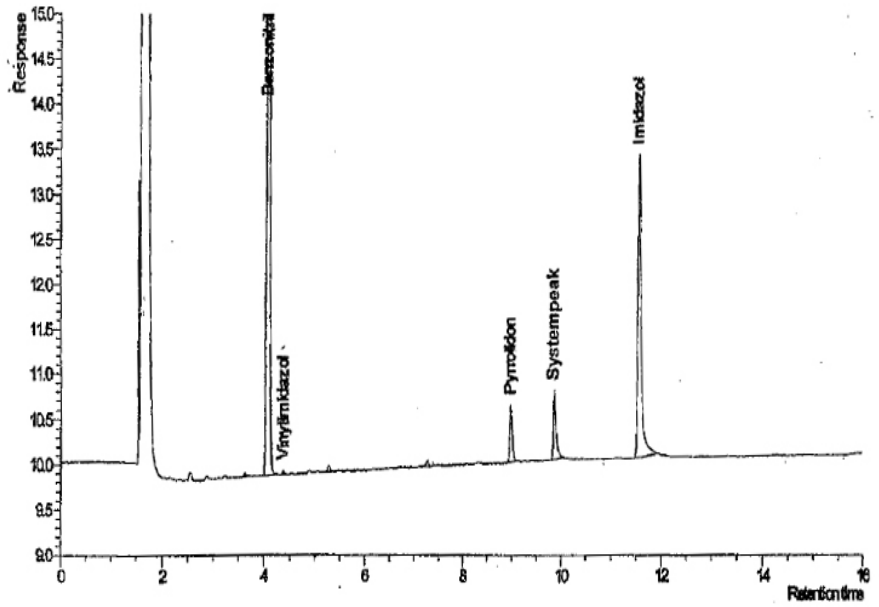


Fig. 1 : Chromatogramme de l'extrait du copolymère (avec étalon interne.)

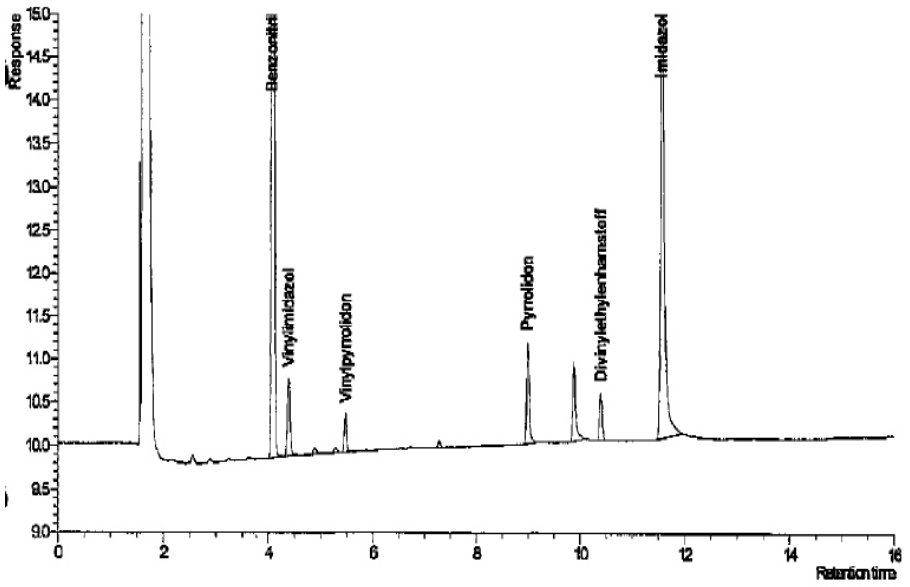


Fig. 2 Chromatogramme de l'extrait du copolymère (avec étalon interne), supplémenté par 2,1 µg/g de vinylimidazol, 2,1 µg/g de vinylpyrrolidone, 3,9 µg/g de pyrrolidone, 2,1 µg/g de divinyléthylène-urée, 12,7 µg/g d'imidazol.

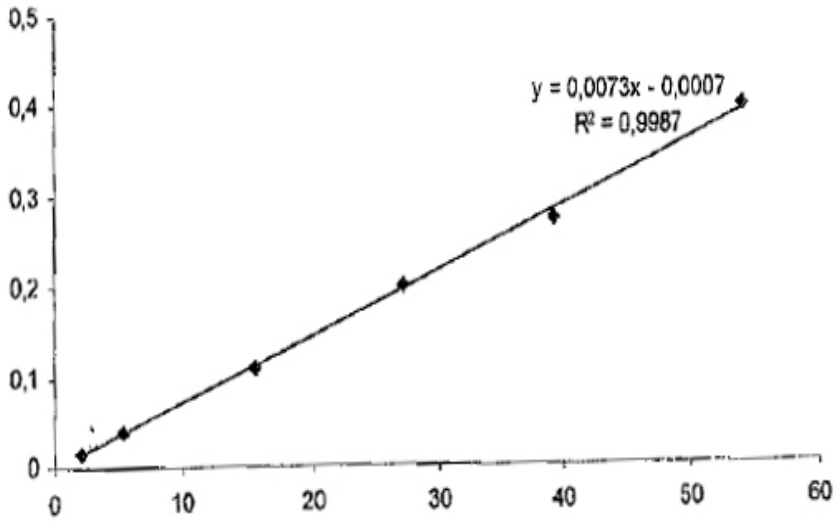


Fig. 3 : droite de calibrage du vinylimidazol
Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)
Surface du pic (std. int.) [mg]
Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [µg/g]

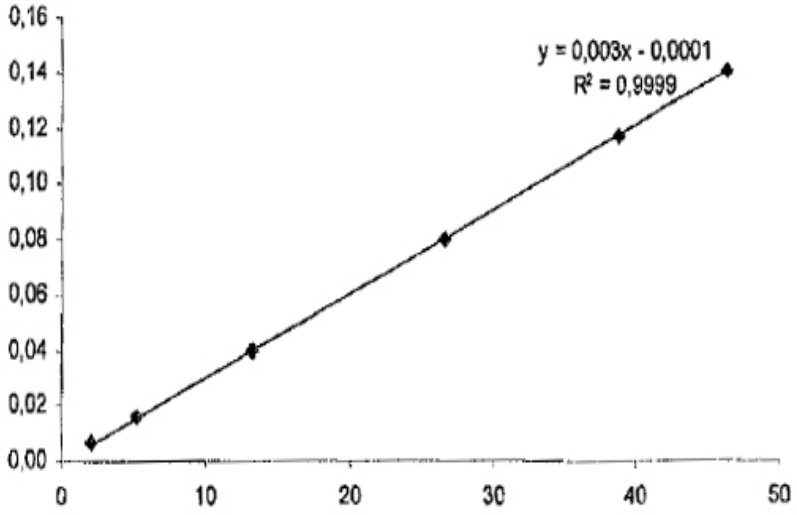


Fig. 4 : droite de calibrage de la vinylpyrrolidone
Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)
Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [µg/g]

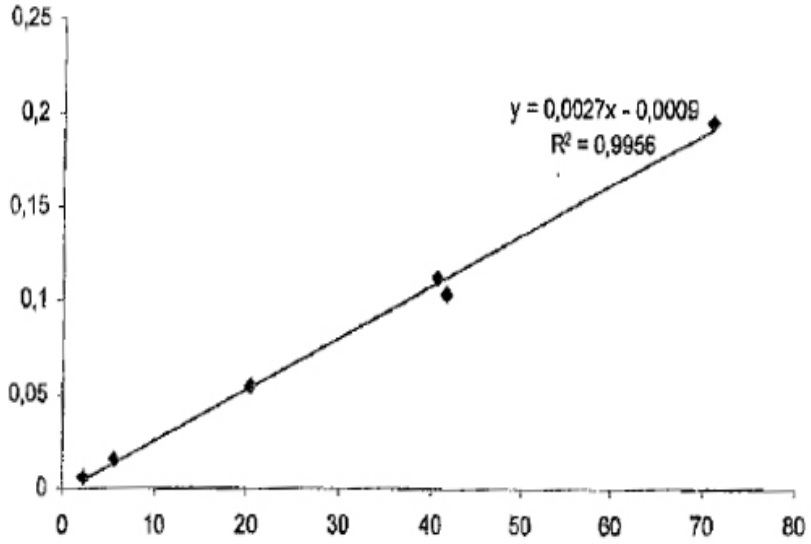


Fig. 5 : droite de calibrage de la pyrrolidone

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)
Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [µg/g]

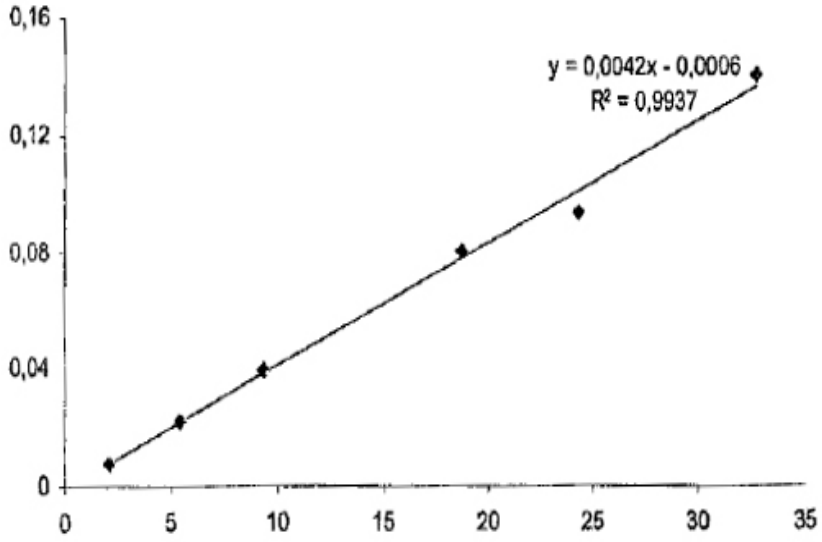


Fig. 6 : droite de calibrage de la divinyléthylène-urée

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)
Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [µg/g]

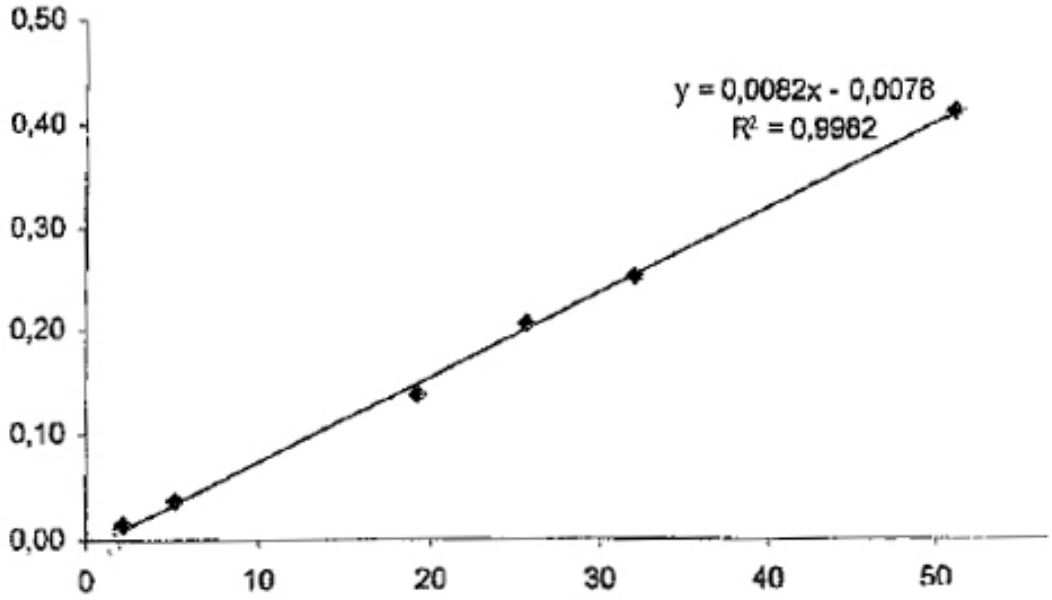


Fig. 7 : droite de calibrage de l'imidazol

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)
Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [µg/g]

Annexe 2

Procédé analytique pour la détection d'imidazole, de pyrrolidone et de monomères résiduels (vinylpyrrolidone, vinylimidazole, divinylimidazolidinone) dans les vins et les moûts

1 Champ d'application

Le procédé décrit convient à la détermination d'imidazole, de pyrrolidone, de vinylimidazole et de vinylpyrrolidone dans les moûts et vins blancs, rouges, doux et secs.
La divinylimidazolidinone a une demi-vie de 3,75 minutes à un pH de 3,7. Une détermination n'est donc pas possible dans le vin et le moût.
L'étude porte sur une gamme de concentration de 5 à 125 µg/l pour l'imidazole, de 25 à 250 µg/l pour le pyrrolidone, de 2 à 25 µg/l pour le vinylimidazole et de 2 à 12,5 µg/l pour le vinylpyrrolidone.

2 Définitions

CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CL-SM	Chromatographie liquide – Spectrométrie de masse
MRM	*Multiple Reaction Monitoring*

3 Principe

Des échantillons sont analysés directement par CL-SM dans une colonne de phase inversée (C18). La détection est ensuite pratiquée en mode MRM.

4 Réactifs et matières

1.1 Substances chimiques

1.1.1 Méthanol (LiChrosolov) (CAS : 67-56-1) qualité pour CL-SM

1.1.2 Eau bidistillée

1.1.3 Acide heptafluorobutyrique, puriss., ≥99,5 % (CAS : 375-22-4)

1.2 Préparation des éluants

1.2.1 Solvant A :

Verser une pipette 0,6 ml d'acide heptafluorobutyrique (4.1.3) dans 1 000 ml d'eau bidistillée (4.1.2), agiter et dégazer.

1.2.2 Solvant B :

Ajouter 300 ml d'eau bidistillée (4.1.2) dans 700 ml de méthanol (4.1.1) et agiter. Verser la pipette 0,6 ml d'acide heptafluorobutyrique (4.1.3) dans cette solution, agiter et dégazer.

1.3 Étalons

1.3.1 Imidazole, ≥99,5 % (CAS : 288-32-4)

1.3.2 Pyrrolidone, ≥99 % (CAS : 616-45-5)

1.3.3 Vinylimidazole, ≥99 % (CAS : 1072-63-5)

1.3.4 Vinylpyrrolidone, =99,8 % (CAS : 88-12-0)

1.4 Préparation de solutions standard

1.4.1 Préparation des solutions mères standard (1,00 g/l) :

Doser exactement 100 mg d'étalon (4.3.1-4.3.4), le verser intégralement dans une fiole jaugée à 100 ml, ajouter de l'eau bidistillée (4.1.2) jusqu'à environ 90 ml, agiter et ajuster à 100 ml.

1.4.2 Préparation de la solution standard mixte (imidazole : 62,5 mg/l ; pyrrolidone : 62,5 mg/l ; vinylimidazole : 12,5 mg/l ; vinylpyrrolidone : 6,25 mg/l) :

Verser une pipette 6,25 ml de la solution mère d'imidazole (4.4.1), une pipette 6,25 ml de la solution mère de pyrrolidone (4.4.1), une pipette 1,25 ml de la solution mère de vinylimidazole (4.4.1) et une pipette 0,625 ml de la solution mère de vinylpyrrolidone (4.4.1) dans une fiole jaugée à 100 ml, ajouter de l'eau bidistillée (4.1.2) jusqu'à environ 90 ml, agiter et ajuster à 100 ml.

1.4.3 Préparation de la solution standard préparée :

Verser une pipette 40 µl de solution standard mixte (4.4.2) dans une fiole jaugée à 25 ml, ajouter de l'eau bidistillée jusqu'à 25 ml et agiter.

1.5 Préparation de la courbe d'étalonnage matriciel

Des solutions d'étalonnage matriciel sont préparées dans un vin ou un moût non contaminé. Diluer la solution standard mixte (4.4.2) avec l'échantillon de manière à obtenir cinq étalons de travail.
Les solutions-étalons doivent être préparées juste avant la mesure !

Volume final	Étalon mixte	Imidazole	Pyrrolidone	Vinylimidazole	Vinylpyrrolidone
25 ml	0 µl	0 µg/l	0 µg/l	0 µg/l	0 µg/l
25 ml	10 µl	25 µg/l	25 µg/l	5 µg/l	2,5 µg/l
25 ml	20 µl	50 µg/l	50 µg/l	10 µg/l	5 µg/l
25 ml	30 µl	75 µg/l	75 µg/l	15 µg/l	7,5 µg/l
25 ml	40 µl	100 µg/l	100 µg/l	20 µg/l	10 µg/l
25 ml	50 µl	125 µg/l	125 µg/l	25 µg/l	12,5 µg/l

5 Appareillage

1.6 Balance d'analyse, précision de 0,1 mg

1.7 Diverses pipettes de précision et fioles jaugées

1.8 Fioles CLHP (4 ml)

1.9 Chromatographe liquide à haute performance avec détecteur spectrométrique de masse (Applied Biosystems API 4000 ou équivalent)

1.10 Knauer Eurospher 100-5 C18 avec précolonne intégrée ou équivalent
Diamètre intérieur : 4,6 mm
Longueur : 250 mm
Phase stationnaire : C18, dimension des pores : 100 Å, dimension des particules : 5 µm, avec embout

6 Préparation des échantillons

6.1 Solution de vin modèle

La solution de vin modèle est préparée selon Martínez Rodríguez et Polo, 2000 (Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System).

Quatre grammes d'acide tartrique, 0,1 g d'acide acétique et 120 ml d'éthanol sont dissous dans 800 ml d'eau (bidist.). Après ajustement de la valeur pH à 3,2 avec une solution d'hydroxyde de sodium 2N, la solution est complétée à 1000 ml. La solution de vin modèle est tempérée à 20 ° C.

6.2 Préparation des échantillons pour l'analyse des migrations

Une quantité de 0,5 grammes de Divergan HM est ajoutée à 1 litre de solution de vin modèle puis agitée à 20 ° C pendant 48 heures (environ 150 rpm).

Préalablement à l'analyse, l'échantillon est centrifugé (env. 3 min, 4500 rpm) et filtré à travers un filtre à membrane de 0,45 micromètre.

6.3 Autres échantillons (par exemple moûts et vins)

Les échantillons de matière claire sont directement versés dans les fioles à échantillon et passés en chromatographie sans aucune préparation. Les

échantillons de vin trouble sont filtrés par un filtre à membrane de 0,45 µm avant l'injection et les premières fractions de filtrat sont éliminées.

7 Analyse CL-SM

1.11 Conditions de fonctionnement de CLHP :

Volume d'injection : 10 µl
Débit : 1 ml/min

Gradient :

$$85:15\,(A:B) \xrightarrow{10\ mn} 85:15 \xrightarrow{5\ mn} 0:100 \xrightarrow{10\ mn} 0:100 \xrightarrow{5\ mn} 85:15 \xrightarrow{15\ mn} 85:15$$

Chauffage de colonne : 25 °C
Temps d'exécution : 45 mn

1.12 Conditions de SM :

Spectromètre de masse :	Applied Biosystems API 4000 ou équivalent
Type de balayage :	MRM
Polarité :	Positive
Source d'ions :	Turbo Spray
Durée :	20 005 mn ; 1 364 cycles
Barrière de gaz :	40 psi
Tension de pulvérisation ionique :	2 500 V
Température :	550 °C
Gaz source d'ions 1 :	60 psi
Gaz source d'ions 2 :	60 psi
Gaz de collision :	Moyen
Potentiel d'entrée :	10 V
Collier 2 :	0

Composé	Masse Q1 (amu)	Masse Q3 (amu)	Pause (msec)	Paramètre	Démarrage	Arrêt

Imidazole	69,08	42,20	75,00	PD	81,00	81,00
				EC	31,00	31,00
				PSCC	2,00	2,00
Pyrrolidone	86,10	44,10	75,00	PD	66,00	66,00
				EC	31,00	31,00
				PSCC	6,00	6,00
	86,10	69,00	75,00	PD	66,00	66,00
				EC	23,00	23,00
				PSCC	4,00	4,00
Vinylimidazole	95,09	41,10	75,00	PD	71,00	71,00
				EC	33,00	33,00
				PSCC	0,00	0,00
	95,09	69,20	75,00	PD	71,00	71,00
				EC	29,00	29,00
				PSCC	12,00	12,00
Vinylpyrrolidone	112,08	69,20	75,00	PD	51,00	51,00
				EC	21,00	21,00
				PSCC	4,00	4,00
	112,08	84,00	75,00	PD	51,00	51,00
				EC	17,00	17,00
				PSCC	14,00	14,00

PD : Potentiel de dissociation (en volts)
EC : Énergie de collision (en volts)
PSCC : Potentiel de sortie des cellules de collision (en volts)

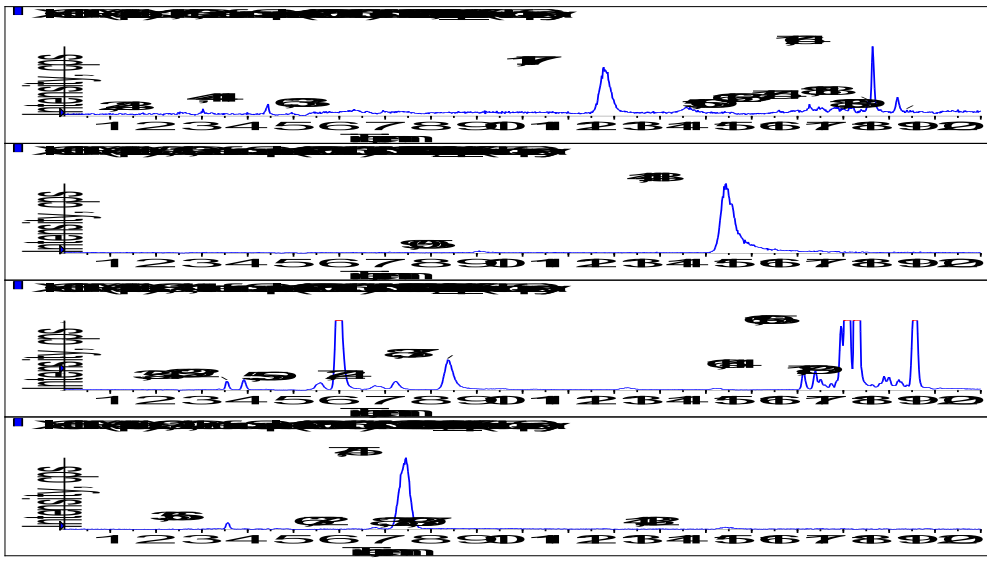
8 Évaluation

1.13 Identification :

Injecter 10 µl de solution standard préparée (4.4.3) pour examiner les temps de rétention. Temps de rétention approximatifs :

Composé	Temps de rétention
Imidazole	7,45 mn
Pyrrolidone	8,37 mn

Vinylimidazole	14,43 mn
Vinylpyrrolidone	17,64 mn



1.14 Quantification :

Transferts de masse pour quantification :

Composé	Transfert de masse
Imidazole	69,1 → 42,2
Pyrrolidone	86,1 → 44,1
Vinylimidazole	95,1 → 69,2
Vinylpyrrolidone	112,1 → 69,2

Ajouter des doses standard pour la quantification.

1.15 Expression des résultats

Les résultats doivent être exprimés en µg/l pour l'imidazole, le pyrrolidone, le vinylimidazole et le vinylpyrrolidone, sans décimales (ex. : 3 µg/l).

1.16 Limite de détection et limite de quantification

Le seuil de détection (LD) et le seuil de quantification (LQ) dépendent des conditions individuelles de mesure de l'analyse chimique et doivent être déterminés par la personne appliquant le procédé.
Le seuil de détection (LD) et le seuil de quantification (LQ) ont été estimés sur la base des instruments et des conditions spécifiés ci-avant (s. 7) à titre d'exemple, suivant les instructions de la résolution OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET) « Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse ». Conformément au « Diagramme logique pour la prise de décision » au n° 3, l'approche graphique doit être appliquée selon les dispositions du paragraphe 4.2.2. À cette fin, une partie du chromatogramme MRM est développée pour montrer une gamme de largeurs du pic x10 à mi-hauteur ($w_{½}$) d'un pic de substance à analyser dans la partie concernée du chromatogramme. En outre, deux lignes parallèles sont tracées, englobant simplement l'amplitude maximale de la fenêtre de signaux. La distance de ces

deux lignes donne h_{max}, exprimée en unités d'abondance ; elle est ensuite multipliée par 3 pour LD et par 10 pour LQ, puis convertie en unités de concentration avec le facteur de réponse individuel.

Composé	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)
Imidazole	5 µg/l	12 µg/l
Pyrrolidone	25 µg/l	83 µg/l
Vinylimidazole	2 µg/l	6 µg/l
Vinylpyrrolidone	2 µg/l	6 µg/l

9 Précision et exactitude

À l'instar des matrices, trois différents vins (vin blanc sec, vin rouge sec et vin rouge doux) et du jus de raisin ont été utilisés. La reproductibilité en laboratoire, la répétabilité et la récupération ont été calculées sur la base de l'étalonnage matriciel et de trois mutages (imidazole : 40/60/80 µg/l ; 2-pyrrolidone : 40/60/80 µg/l ; vinylimidazole : 8/12/16 µg/l ; vinylpyrrolidone : 4/6/8 µg/l).

	Mutage	**Série moyenne**	**Écart-type**	**Correspondance CV**	**Rel. std. Horwitz %**
Reproductibilité en laboratoire (SD_{wIR}) :	40 µg/l	41	2	**5 %**	26
	60 µg/l	61	3	**5 %**	24
	80 µg/l	80	5	**6 %**	23
Répétabilité (SD_r) :	40 µg/l	41	1	**2 %**	
	60 µg/l	61	2	**3 %**	
	80 µg/l	80	4	**5 %**	
Récupération (WDF) :	40 µg/l	**102 %**			
	60 µg/l	**101 %**			
	80 µg/l	**101 %**			
	Ø	101 %			

1.17 Pyrrolidone

	Mutage	Série moyenne	Écart-type	Correspondance CV	Rel. std. Horwitz %
Reproductibilité en laboratoire (SD_{wIR}) :	40 µg/l	42	9	**22 %**	26
	60 µg/l	60	9	**15 %**	24
	80 µg/l	81	9	**11 %**	23
Répétabilité (SD_r) :	40 µg/l	42	5	**12 %**	
	60 µg/l	60	4	**7 %**	
	80 µg/l	81	8	**9 %**	
Récupération (WDF) :	40 µg/l	**105 %**			
	60 µg/l	**100 %**			
	80 µg/l	**101 %**			
	Ø	102 %			

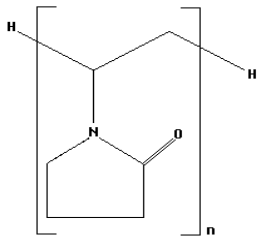
1.18 Vinylimidazole

	Mutage	Série moyenne	Écart-type	Correspondance CV	Rel. std. Horwitz %
Reproductibilité en laboratoire (SD_{wIR}) :	8 µg/l	8	0	**4 %**	33
	12 µg/l	12	1	**5 %**	31
	16 µg/l	16	1	**4 %**	30
Répétabilité (SD_r) :	8 µg/l	8	0	**4 %**	
	12 µg/l	12	0	**3 %**	
	16 µg/l	16	0	**3 %**	
Récupération (WDF) :	8 µg/l	**101 %**			
	12 µg/l	**102 %**			
	16 µg/l	**102 %**			
	Ø	102 %			

1.19 Vinylpyrrolidone

	Mutage	Série moyenne	Écart-type	Correspondance CV	Rel. std. Horwitz %
Reproductibilité en laboratoire (SD_{wIR}) :	4 µg/l	3	1	**31 %**	37
	6 µg/l	4	1	**26 %**	35
	8 µg/l	5	2	**29 %**	33
Répétabilité (SD_r) :	4 µg/l	3	1	**25 %**	
	6 µg/l	4	1	**22 %**	
	8 µg/l	5	1	**26 %**	
Récupération (WDF) :	4 µg/l	**66 %**			
	6 µg/l	**63 %**			
	8 µg/l	**66 %**			
	Ø	65 %			

POLYVINYLPOLYPYRROLIDONE
POVIDONE
(PVPP)
(C_6H_9NO)n = (111,1)n
N° SIN : 1202
(Oeno 11/2002 modifiée par Oeno 4/2007)



1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La polyvinylpolypyrrolidone insoluble est un polymère poly[1-(2-oxo-1-pyrrolidinyléthylène] réticulé de façon à la rendre insoluble. Elle est fabriquée par polymérisation de la N-vinyl-2-pyrrolidone en présence de divers catalyseurs (par exemple de l'hydroxyde de sodium) ou en présence de N,N'-divinylimidazolidone.
La PVPP fixe les polyphénols des vins, cette adsorption dépend du taux de polymérisation. Sa dose d'utilisation est limitée.

2. SYNONYMES

poly(1-éthénylpyrrolidin-2-one)
Crospovidone (nomenclature de la pharmacopée)
Polyvidone réticulée
Homopolymère réticulé de 1-éthényl-2-pyrrolidone
Polymère réticulé insoluble de la N-vinyl-2-pyrrolidone
P.V.P. insoluble
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP).

3. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner que la PVPP est à usage oenologique, l'efficacité minimum garantie vis-à-vis du test et les conditions de sécurité et de conservation.

4. CARACTERES

Poudre légère, blanc à blanc crème.
Insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques.
Insoluble dans les acides minéraux forts et les alcalins.

5. ESSAIS

5.1 Perte à la dessiccation

Placer 2 g de PVPP dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre; dessécher à l'étuve à 100-105° C durant 6 heures.
Laisser refroidir en dessiccateur. Peser. La perte de poids doit être inférieure à 5 p. 100.
Il est également possible de réaliser cette mesure plus rapidement par titration avec le procédé Karl-Fischer. (Voir annexe).

Remarque : Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

5.2 Cendres

Incinérer progressivement sans dépasser 600° C le résidu laissé dans l'essai 5.1.
Le poids des cendres doit être inférieur à 0,5 p. 100.

5.3 Préparation de la solution pour essais

Après la pesée des cendres, les dissoudre dans 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau distillée. Chauffer pour activer la dissolution. Porter à 20 ml avec de l'eau distillée. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0,10 g de PVPP.

5.4 Métaux lourds

10 ml de solution préparée selon le point 5.3 sont placés dans un tube à essai avec 2 ml d'une solution tampon pH 3,5 (R) et 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Aucun précipité ne doit se produire. Si une coloration brune apparaît, elle doit être inférieure à celle présentée par le témoin comme il est indiqué au Chapitre II.
La teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, doit être inférieure à 10 mg/kg.

5.5 Plomb

Sur la solution pour essais préparée selon le point 5.3, doser le plomb par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

5.6 Mercure
Doser le mercure selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.7 Zinc
Doser le zinc selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en zinc doit être inférieure à 5 mg/kg.

5.8 Arsenic
Doser l'arsenic selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

5.9 Cadmium
Effectuer le dosage du cadmium à l'aide de la méthode décrite au Chapitre II du Codex œnologique international par spectrometrie d'absorption atomique.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.10 Sulfates
Doser les sulfates selon la méthode décrite au Chapitre II.
La teneur en sulfates doit être inférieure à 1 g/kg.

5.11 Dosage de l'azote total
Introduire environ 0,20 g de PVPP exactement pesé dans un ballon de 300 ml avec 15 ml d'acide sulfurique concentré (R) et 2 g de catalyseur de minéralisation (R) et poursuivre l'opération comme il est indiqué au Chapitre II.
La teneur en azote total doit être comprise entre 11 et 12,8 %.

5.12 Solubilité en milieu aqueux
Introduire 10 g de PVPP dans un ballon de 200 ml contenant 100 ml d'eau distillée. Agiter et laisser en contact pendant 24 heures. Filtrer sur filtre écran de porosité 2,5 μm puis sur un filtre écran de porosité 0,8 μm. Le résidu laissé par l'évaporation du filtrat sec, sur bain d'eau à 100° C, doit être inférieur à 50 mg.
La solubilité dans l'eau doit être inférieure à 0,5 p. 100.

5.13 Solubilité en milieu acide et alcoolique.

Introduire 1 g de PVPP dans un ballon contenant 500 ml du mélange suivant :

Acide acétique	3 g
Ethanol	10 ml
Eau	100 ml

Laisser en contact pendant 24 heures. Filtrer sur un filtre écran de porosité 2,5 μm puis sur un filtre écran de porosité 0,8 μm. Concentrer le filtrat sur un bain d'eau à 100° C. Terminer l'évaporation sur bain d'eau à 100° C dans une capsule en silice de 70 mm de diamètre préalablement tarée. Le résidu laissé par évaporation à sec doit être inférieur à 10 mg, compte tenu du résidu laissé éventuellement par l'évaporation de 500 ml du mélange acide acétique-éthanol.

La solubilité en milieu acétique et alcoolique doit être inférieure à 1 p. 100.

6. EFFICACITE DE LA PVPP VIS-A-VIS DE L'ADSORPTION DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES.

6.1. Test à l'acide salicylique

6.1.1 Réactifs :

- Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.
- Solution d'acide salicylique 0,1 M (13,81 g d'acide salicylique sont dissous dans 500 ml de méthanol dilué à 1l avec de l'eau.

6.*1.2 Mode opératoire :*

- Peser 2-3 grammes de PVPP dans une fiole conique de 250 ml et noter le poids W, à ± 0,001 g.
- Calculer l'extrait sec de l'échantillon (pourcentage de solide) noter P en % à la décimale près.
- Ajouter la solution d'acide salicylique 0,1 M selon la formule :

$$43 \cdot W \cdot P = \text{ml à ajouter}$$

- Fermer le flacon et agiter pendant 5 minutes.

- Verser le mélange à 25° C sur un filtre déposé sur un entonnoir Büchner relié à un flacon de 250 ml ; faire le vide jusqu'à obtenir au moins 50 ml de filtrat (le filtrat doit être clair).
- Pipeter 50 ml de filtrat et le mettre dans une fiole conique de 250 ml.

- Déterminer avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M le point de neutralisation à la phénolphtaléine et noter le volume Vs.
- Titrer 50 ml d'une solution d'acide salicylique (témoin) de la même manière, et noter le volume Vb.

6.1.3 Calcul :

$$\% \text{ activité} = \frac{Vb - Vs}{Vb} \cdot 100$$

Le pourcentage d'activité doit être égal ou supérieur à 30 p. 100

6.2. Determination de la capacité d'adsorption de l'oenocyanine (30p. 100 minimum

6.2.1. Principe

Une petite quantité de PVPP est mise en contact avec une solution d'oenocyanine pendant 5 minutes. L'adsorption à 280 nm de la solution d' oenocyanine traitée est comparée à celle de la solution étalon par rapport à un blanc composé seulement de solvant. La réduction de l'adsorption à 280 nm est utilisée en tant que mesure relative de la capacité de la PVPP à adsorber l' oenocyanine.

6.2.2. Réactifs

- oenocyanine (hydrate d')
- Ethanol (absolu)
- Eau distillée.

6.2.3. Appareil

- Spectrophotomètre, UV visible.
- Cuves en quartz, 1 cm de trajet optique.
- Béchers, 150 ml.
- Fiole jaugée, 1 litre.
- Barreaux d'agitation en téflon et agitateur magnétique.
- Seringues.
- Filtres pour seringues, (porosité 0,45 µm).

6.2.4. Mode opératoire

- Solution E. Dissoudre 80 mg d'hydrate d'oenocyanine dans 50 ml d'éthanol. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée d'un litre (avec de l'eau distillée) et diluer au volume marqué avec de l'eau distillée. Etiqueter sous le nom Solution E, et conserver dans un flacon ambré. Cette solution est la solution étalon.

- Solution R. Préparer la solution de référence en diluant 50 ml d'éthanol dans 1 litre d'eau distillée. Cette solution est la solution R (de référence).

- Peser, en triple, 50 mg $\pm$ 0,1 mg de l'échantillon dans des béchers de 150 ml. Y ajouter le barreau d'agitation en téflon et placer sur un agitateur magnétique.

NOTE : Le temps de contact entre l'échantillon et la solution est *critique*. Au cours des étapes suivantes, l'addition de la solution aux échantillons se fera par échelonnements afin de prévoir exactement 5 minutes entre l'introduction de la solution et la filtration de chaque échantillon.

- A l'aide d'une pipette, ajouter 100 ml de la solution E à deux des échantillons et ajouter 100 ml de la solution R au troisième échantillon. Mettre la minuterie en marche après que les 100 ml ont été ajoutés.
- Agiter pendant 5 minutes $\pm$ 5 secondes.

- Retirer immédiatement une partie de la solution et filtrer dans une fiole propre, à l'aide d'une seringue et d'un filtre dont le diamètre des pores est de 0,45 µm. Les solutions filtrées peuvent être conservées dans un endroit frais et sombre pendant 1 heure au maximum avant de mesurer l'absorbance UV.
- Installer le spectrophotomètre UV conformément aux instructions du fabricant concerné afin de mesurer l'absorbance à 280 nm. Mettre l'appareil à zéro sur 280 nm en utilisant la solution R comme blanc.
- Mesurer le degré d'absorbance de chaque extrait filtré à 280 nm par rapport à la solution R en utilisant des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

6.2.5. Calculs

$$\text{Capacité adsorbante} = \frac{A_o - (A_T - A_B) \times 100}{A_B}$$

Sachant que :
A_o = Absorbance de la solution E
A_T = Absorbance de la solution échantillon
A_B = Absorbance de la solution à blanc (PVPP sans oenocyanine)

Rapporter la moyenne des deux solutions échantillon.

7. DETERMINATION DU MONOMERE N-VINYL-2-PYRROLIDONE DANS LA PVPP A L'AIDE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE AVEC DETECTION UV.

7.1. Principe

Le monomère N-vinyl-2-pyrrolidone est extrait du polymère PVP avec le méthanol. La solution de méthanol est analysée par CLHP en utilisant une colonne en phase inversée de type C8 désactivée, la quantification s'effectue par détection UV à 235 nm. La PVP soluble est éliminée de l'entrée de la colonne par une technique de rétrobalayage automatique (backflush).
Cette méthode est applicable aux échantillons dont la concentration en monomère est comprise entre 0,4 et 100 mg/l.
La teneur en N-vinyl–2–pyrrolidone dans la PVPP ne doit pas excéder 10 mg par kg.

7.2. Réactifs

- Méthanol, classe CLHP.
- Eau, microfiltrée de résistivité > 18 MΩ.
- N-vinyl-2-pyrrolidone

7.3. Appareillage

7.3.1 Verrerie

- Assemblage CLHP pour filtrer les solvants ; entièrement en verre.
- Filtres pour phases mobiles, nylon 0,45 μm.
- Pipettes graduées (10, 20 et 100 ml).
- Fioles jaugées (100 et 1000 ml).

- Pipettes de 7,5 ml, en polyéthylène.
- Spatules convenant à la manipulation de grammes de poudre.
- Petites fioles avec bouchons en polyéthylène.
- Filtres de porosité 0,45 μm en microfibre de verre.

7.3.2. Instruments
- Balance permettant la lecture jusqu'à 0,1 mg.
- Agitateur magnétique
- Système CLHP avec colonne de type C8 et détecteur UV-Visible.

7.4. Mode opératoire

7.4.1. Préparation de la phase mobile
- A l'aide d'une pipette introduire 200 ml de méthanol classe CLHP dans un fiole jaugée de 1000 ml. Diluer au volume requis avec de l'eau classe CLHP et mélanger.
- Filtrer/dégazer la phase mobile et la transférer ensuite dans le réservoir de solvant pour la pompe CLHP.

7.4.2. Préparation des étalons
- Solution étalon VP 1000 mg/l

Peser environ 100 mg de N-vinyl-2-pyrrolidone à 0,1 mg près, dans une fiole jaugée de 100 ml. Diluer au volume requis avec la phase mobile.
- Solution étalon VP 100 mg/l

Diluer 10 ml de la solution à 1000 mg/l au volume requis, avec la phase mobile, dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Solution étalon VP 10 mg/l.

Diluer 10 ml de la solution à 100 mg/l au volume requis, avec la phase mobile, dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Solution étalon VP 1 mg/l

Diluer 10 ml de la solution à 10 mg/l au volume requis, avec la phase mobile, dans une fiole jaugée de 100 ml.

7.4.3. Préparation de l'échantillon
- Dans une petite fiole, peser environ 2,0 g de PVPP à 0,1 mg près.
- A l'aide d'une pipette, introduire 20 ml de méthanol classe CLHP dans la fiole contenant l'échantillon.
- Fermer hermétiquement la fiole et la placer sur l'agitateur automatique. Extraire pendant une heure à une vitesse de 130 rotations par minute.
- Après une heure, retirer la fiole de l'agitateur. Filtrer le surnageant à travers un filtre de porosité 0,45 μm en microfibre de verre.

7.4.4. Analyse par CLHP

Installer l'appareil de CLHP conformément aux instructions du fabricant et équilibrer la colonne et le détecteur avec la phase mobile pendant au moins une heure avant d'analyser l'étalon et les échantillons.

Conditions de CLHP (à titre d'exemple) :

Vol. d'injection	20 microlitres
Débit du solvant	1 ml/minute
Détection	235 nm
Durée	10 minutes pour les étalons sans rétrobalayage de colonne, 60 minutes pour les échantillons avec rétrobalayage de colonne, dont 10 minutes pour le rétrobalayage et 50 minutes pour le reconditionnement de la colonne.

- Injecter un étalon de 10 mg/l de N-vinyl-2-pyrrolidone (concentration absolue) à trois reprises tous les 6 à 10 échantillons afin de contrôler la performance du système.

7.4.5. Calculs

$$\text{mg/l de VP} = \frac{20 \times (\text{aire du pic de l'échantillon}) \times (\text{Facteur de réponse})}{\text{échantillon en grammes}}$$

$$\text{avec facteur de réponse} = \frac{(\text{concentration d'étalon en mg/l})}{(\text{aire du pic de l'étalon})}$$

Remarque :

- Limite de détection et quantité minimale quantifiable

La limite de détection (signal/bruit = 3 pour un échantillon de PVPP avec une teneur de 0,27 mg/l en N-vinyl-2-pyrrolidone) est de ~ 0,10 mg/l avec une quantité minimale quantifiable (signal/bruit = 10) de 0,33 mg/l.

- Récupération

Lors d'un essai au laboratoire, la N-vinyl-2-pyrrolidone, surchargée avec du PVPP à raison de 1, 10 et 100 mg/l de VP, a été respectivement récupérée à 108 %, 99,0 % et 102 % .

- Temps de rétention

La durée moyenne de rétention du pic de N-vinyl-2-pyrrolidone (au taux de 10 mg/l) est de 6,34 ± 0,08 minutes, pour un système colonne + précolonne de 13 cm de long.

- Interférences

La durée appropriée de rétrobalayage sera déterminée pour chaque système et on l'effectuera rigoureusement sans quoi un blocage de la colonne pourrait se produire.

8. DETERMINATION DE LA N,N'-DIVINYLIMIDAZOLIDONE LIBRE DANS LA PVPP A L'AIDE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Cette détermination est à effectuer lorsque la technique de préparation de la PVPP utilise le N,N'-divinylimidazolidone.

- la teneur en N,N'-divinylimidazolidone libre dans la PVPP ne doit pas excéder 2 mg par kg.

8.1. Principe

Dosage par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire du N',N-divinylimidazolidone libre dans un solvant (acétone) à partir de PVPP non soluble. La limite de détection est de 1 mg/kg.

8.2. Solution de l'étalon interne :

Dissoudre 100 mg de nitrile d'acide heptanoïque pesé à 0,1 mg près dans 500 ml
d'acétone.

8.3. Préparation de l'échantillon

Peser de 2 à 2,5 g de polymère à 0,2 mg près et verser dans une fiole conique de 50 ml. A l'aide d'une pipette, ajouter 5 ml de solution de l'étalon interne, puis 20 ml d'acétone. Agiter le mélange pendant 4 heures, puis laisser reposer et stabiliser au moins 15 heures et analyser le liquide surnageant par chromatographie en phase gazeuse.

8.4. Solution d'étalonnage

Peser 25 mg de N,N'-divinylimidazolidone à 0,2 mg près (le standard analytique peut être obtenu auprès de laboratoires spécialisés, actuellement BASF, D-67056 Ludwigshafen) et verser dans une fiole jaugée; porter à 100 ml avec de l'acétone. A l'aide d'une pipette, transférer 2,0 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 50 ml et porter à 50 ml avec de l'acétone. Transvaser 2 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 25 ml, ajouter 5 ml de la solution de l'étalon interne (voir plus haut) et ajuster au volume avec de l'acétone.

8.5. Conditions de la chromatographie en phase gazeuse (à titre d'exemple) :

Colonne (silice fondue) capillaire (Carbowax réticulé - 20 M), longueur 30 m, diamètre intérieur 0,25 mm, épaisseur du film 0,5 µm.

Colonne température programmée	140°C à 240°C, 4°C/ minute.
Injecteur	injecteur split, 220°C. débit de purge 30 ml/min.
Détecteur	Détecteur thermoïonique (optimisé conformément aux instructions du fabricant), 250°C.
Gaz vecteur	Hélium, 1 bar (suppression).
Volume injecté	1 µl de solution surnageante d'échantillon ou de solution d'étalonnage.

8.6. Procédure

Validation du facteur de réponse pour les conditions spécifiques d'analyse grâce à des injections répétées de solution d'étalonnage.

Analyse de l'échantillon. La teneur en N,N'-divinylimidazolidone dans la PVPP non soluble ne doit pas être supérieure à 0,1 %.

8.7. Calcul du facteur de réponse :

$$f = \frac{Wd \times Ase}{Wse \times Ad}$$

W_d - quantité de N,N'-divinylimidazolidone utilisée (mg)
W_{se} - quantité d'étalon interne (mg)
A_{se} - aire du pic de l'étalon interne
A_d - aire du pic de la N,N'-divinylimidazolidone.

8.8. Calcul de la teneur en N,N'-divinylimidazolidone :

$$C_D = \frac{1000 \times f \times Ad \times Wse}{Ase \times Ws} \quad \text{(mg/kg)}$$

C_D = concentration de la N,N'-divinylimidazolidone (mg/kg)
f = facteur de réponse
A_d = aire du pic pour la N,N'-divinylimidazolidone
W_{se} = quantité d'étalon interne ajoutée à l'échantillon (mg)
A_{se} = aire du pic de l'étalon interne
W_S = quantité d'échantillon utilisée (g)

9. CONSERVATION

La PVPP doit être conservée dans des lieux ventilés dans des récipients étanches à l'abri d'éléments volatils qu'elle peut adsorber.

ANNEXE

Procédé Karl-Fischer.

1. CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode a pour objet de déterminer la teneur en eau dans le PVP à liaison transversale. Les résidus de vinylpyrrolidone n'interféreront pas aux taux habituellement présents (0, 1 %). La méthode détectera l'eau à des concentrations supérieures à 0,05 % (m/m).

2. PRINCIPE

L'échantillon est dissous dans du méthanol anhydre et titré à l'aide du réactif Karl-Fischer (KF) sans pyridine. L'eau réagit avec la solution de titrage de la manière suivante :

$$2RN + H_20 + I_2 + (RNH)S0_3CH_3 \longrightarrow (RNH)S0_4CH_3 + 2(RNH)I$$

Le point final (excès I_2) est déterminé en contrôlant le changement du courant entre deux microélectrodes de platine polarisées. Le titrage KF typique est totalement automatisé et produira directement les niveaux d'eau calculés.

3. REACTIFS

1. Réactif Karl Fischer sans pyridine.
2. Méthanol, anhydre
3. Gel de silice avec indicateur d'humidité pour la dessiccation du tube dans la cellule.
4. Le standard analytique peut être obtenu auprès de laboratoires spécialisés (actuellement BASF, D-67056 Ludwigshafen)

4. APPAREIL

Titrimètre Karl Fischer.

5. METHODE

1. Remplir le récipient de titrage avec 50 ml de méthanol anhydre ou une quantité suffisante pour couvrir les électrodes. Remplir le tube de dessiccation au-dessus de la cellule avec du gel de silice frais.

2. Etalonner la solution de titrage en utilisant de l'eau distillée comme étalon.
   Consigner le poids de l'échantillon et de la tare, tel qu'indiqué dans le manuel des instruments.

L'appareil calculera automatiquement la moyenne du titre et la sauvegardera en mémoire. Pour les appareils plus anciens, calculer le titre moyen (à savoir, la solution de titrage H_2O/ml en mg) pour trois déterminations. Si l'on dispose d'une interface de balance analytique pour consigner le poids de l'échantillon, suivre les instructions du manuel.

3. Ajouter 0,075 g à 0, 150 g d'échantillon (à 0, 1 mg près) dans le récipient de réaction et agiter pendant 2 minutes.
   Consigner le poids de l'échantillon et de la tare. L'appareil mesurera le titrage et déterminera automatiquement le pourcentage de teneur en eau.

4. Faire l'analyse en double exemplaire.

6. CALCULS

1 . Titre de la solution de titrage KF, T

$$\frac{\text{étalon d'eau (en mg)}}{\text{solution de titrage utilisée (en ml)}}$$

2. % d'eau dans l'échantillon

$$\frac{0{,}1\ TV}{S}$$

Quand V = ml de solution de titrage utilisée
S = poids de l'échantillon en grammes.

7. INTERFERENCES

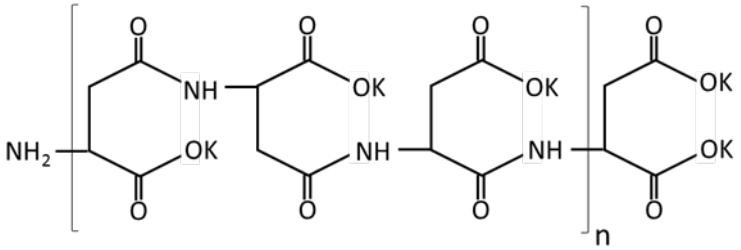
Des concentrations élevées de résidus de vinylpyrrolidone (>0,5 %) réagiront avec l'iode et donneront des résultats très inexacts.
(Un taux résiduel de vinylpyrrolidone de 1 % (p/p) correspond au niveau de H_20 relevé de 0,16% (m/m)). Un excès de base dans l'échantillon risque de modifier le pH de la solution et de donner des résultats peu élevés. Les échantillons avec pH >8 devront être tamponnés avec 5 g d'acide benzoïque pour 50 ml.

POLYASPARTE DE POTASSIUM

Nom chimique : Homopolymère du L-aspartate de potassium ou polyaspartate de potassium

Formule chimique : $[C_4H_5NO_3K]_n$

Formule topologique :



où n ≈ 30

N° CAS : 64723-18-8

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le polyaspartate de potassium œnologique est exclusivement préparé à partir d'acide L-aspartique. L'acide L-aspartique, monomère utilisé dans le procédé, est produit par fermentation. Un procédé thermique transforme le monomère d'acide L-aspartique en polysuccinimide, un composé insoluble. Le polysuccinimide est ensuite traité avec de l'hydroxyde de potassium en conditions contrôlées afin d'obtenir le polyaspartate de potassium. Ce dernier inhibe la précipitation tartrique grâce à un effet « colloïde protecteur ». Le polyaspartate de potassium est efficace pour la stabilisation tartrique des vins.

2. SYNONYMES

Polyaspartate de potassium, A-5D K/SD ; A-5D K SD ; A-5DK/SD ; A-5DK ; KPA.

3. ÉTIQUETAGE

Les indications suivantes doivent apparaître sur l'étiquette de l'emballage :

- le nom et la dénomination de vente,
- la mention « Produit à usage œnologique, utilisation limitée »,
- les additifs éventuels,
- les conditions d'utilisation,

- le numéro de lot et la teneur en polyaspartate de potassium (pureté) ainsi que la date limite d'utilisation et les conditions de stockage (température, humidité et aération),
- le nom ou la raison sociale et l'adresse du fabricant, du conditionneur ou du distributeur,
- la quantité nette,
- l'indication que l'acide aspartique provient d'organismes génétiquement modifiés et, le cas échéant, du caractère modifié.

4. CARACTÉRISATION

4.1 Description

Poudre brun clair inodore contenant 90 % de matière sèche. Elle est entièrement soluble dans l'eau (> 1000 g/L), mais insoluble dans les solvants organiques (< 5 g/L), avec une durée de conservation de quatre ans à température ambiante.

4.2 Formule chimique

Le polyaspartate de potassium est un polymère composé d'unités d'acide aspartique présentant la formule générale suivante : $[C_4H_5NO_3K]_n$, où n correspond au degré de polymérisation moyen ($n \approx 30$).

4.3 Degré de substitution

Le degré de substitution du sel de potassium est d'au moins 91,5 % (en termes de substance anhydre), pour garantir une solubilité optimale.

Évaluer le degré de substitution en employant la méthode décrite ci-après (annexe 1).

4.4 Masse moléculaire

Sa masse moléculaire moyenne, déterminée par chromatographie par perméation sur gel, est de 5000 g/mol, ce qui correspond à un optimum pour l'efficacité du produit.

4.5 Composition

La pureté du produit est vérifiée en procédant au dosage de l'acide aspartique après hydrolyse totale du polymère et en comparant cette valeur à la teneur théorique en monomère

contenu dans le polyaspartate de potassium conformément à sa formule moléculaire. Se référer à l'annexe 2 pour la description de la méthode.
La teneur en substance anhydre du polyaspartate de potassium doit être d'au moins 98 %.

1. ESSAIS

1.1 Teneur en acide aspartique libre dans le polyaspartate de potassium

La teneur en acide aspartique libre doit être ≤ 2,0 %.
Le dosage est réalisé selon la méthode décrite en annexe 3.

1.2 Humidité – Perte à la déshydratation

Déterminer la perte de masse d'un gramme de produit sec conservé en étuve à 105 ± 2 °C pendant 12 à 24 heures. La masse doit être constante et la perte de masse doit être inférieure à 10 %.

1.3 Teneur en métaux

Avant de doser les métaux, soumettre l'échantillon à une minéralisation par digestion acide (HNO_3, H_2O_2 et HCl). La minéralisation s'effectue dans un four à micro-ondes. L'échantillon ne doit pas avoir été broyé ni déshydraté avant la minéralisation.
Les réactifs utilisés pour la minéralisation sont les suivants : HNO_3 (65 %) (Suprapur ou similaire), HCl (37 %) (Suprapur ou similaire) et H_2O_2 (35 %).
L'échantillon de polyaspartate (entre 0,5 et 2 g) est introduit dans une fiole jaugée de 100 mL, auquel on ajoute 25 mL de HNO_3, 2 mL de HCl et 3 mL de H_2O_2. À ce stade, le tout est soumis à une digestion dans un four à micro-ondes avec une puissance maximale de 1200 W : puissance à 60 % pendant 1 min, à 30 % pendant 10 min, à 15 % pendant 3 min et à 40 % pendant 15 min. Ensuite, la fiole jaugée est complétée avec

de l'eau bidistillée. Le dosage des métaux est pratiqué sur cette solution ainsi obtenue.

5.3.1. Fer

Doser le fer en suivant la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en fer doit être inférieure à 10 mg/kg.

5.3.2. Arsenic

Doser l'arsenic en suivant la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

5.3.3. Plomb

Doser le plomb en suivant la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

5.3.4. Mercure

Doser le mercure en suivant la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.3.5. Cadmium

Doser le cadmium en suivant la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

ANNEXE 1

1. Détermination du degré de substitution

1.1 Principe

Le degré de substitution du polyaspartate de potassium commercial est déterminé par l'analyse de la teneur en potassium par la méthode ICP-OES.
Le dosage du potassium est réalisé par l'intermédiaire d'une courbe d'étalonnage obtenue en injectant une solution étalon de référence à cinq concentrations différentes.
Pour calculer le degré de substitution, la concentration en potassium mesurée est comparée à la teneur théorique à 100 % de substitution.

1.2 Matériel

1.2.1 Fioles jaugées de 100 mL (classe A)

1.2.2 Chambre d'atomisation cyclonique, torche quartz standard

1.2.3 Bain à ultrasons

1.2.4 Dispositif de filtration à membrane de porosité 0,45 □m

1.3 Réactifs

1.3.1 Acide nitrique (HNO_3) à 65 %

1.3.2 Solution étalon de potassium (K) à 10 000 mg/L (solution étalon de potassium ICP/DCP à 10 000 µg/mL d'HNO_3 à 5 %)

1.3.3 Eau bidistillée de résistivité supérieure à 10 MΩ.cm

1.3.4 Solution aqueuse acidifiée à 0,5 % d'HNO_3 (blanc d'étalonnage) à utiliser comme diluant pour la préparation des solutions d'étalonnage

1.3.5 Solutions d'étalonnage préparées par dilution de la solution mère (point 1.3.2) ; les valeurs de référence sont indiquées ci-après :

	ÉT 1	ÉT 2	ÉT 3	ÉT 4	ÉT 5
Potassium (mg/L)	200	400	600	1000	2000

1.4 Mode opératoire

La préparation à analyser (KPA) est dissoute dans de l'eau bidistillée.

1.4.1 Solution de KPA à 5000 mg/L (a) : peser directement environ 500 g (noter le poids exact) dans une fiole jaugée de 100 mL, compléter avec de l'eau bidistillée (1.3.3) et mélanger dans le bain à ultrasons (1.2.3) pendant au moins 10 minutes. Filtrer sur membranes de porosité 0,45 µm.

1.4.2 Préparer la courbe d'étalonnage à 5 points avec les solutions étalons comme indiqué au point 1.3.5.

Les résultats doivent être calculés sur la moyenne de trois mesures.

Si la concentration se trouve au-delà de la courbe d'étalonnage, l'échantillon doit être dilué pour que sa concentration se trouve dans la courbe d'étalonnage.

Pour calculer le degré de substitution, comparer la concentration en potassium mesurée à la teneur théorique établie à 100 % de substitution (voir point 1.5).

1.5 Calculs

La teneur en potassium est calculée par le processeur du logiciel d'acquisition. Le calcul à effectuer est le suivant :

$A = A' \times n$ (a)

où :

A : concentration en mg/L de l'échantillon,

A' : concentration en mg/L de l'échantillon dilué,

n : facteur de dilution.

Le pourcentage de potassium dans l'échantillon de KPA, exprimé en poids sec, est calculé avec la formule (b) :

$$\%K_{(poids\,\mathrm{sec})} = A \cdot \frac{100}{w} \cdot \frac{100}{(100 - h\%)} \qquad \text{(b)}$$

où :

A : résultat de l'équation (a),

w : mg/L de polyaspartate de potassium

h% : humidité de l'échantillon (pourcentage d'humidité).

Le degré de substitution (DS_K) est calculé avec l'équation (c) :

$$\%DS_K = \frac{\%K_{(poids\,\mathrm{sec})}}{\frac{MA_K}{MM_{monomèreKPA}} \cdot 100} \qquad \text{(c)}$$

où :

MA_K : masse atomique du potassium,
$MM_{monomèreKPA}$: masse moléculaire calculée du monomère de polyaspartate.

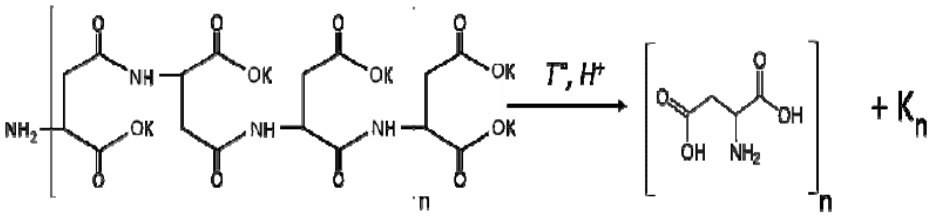
ANNEXE 2

2. Détermination de la pureté du polyaspartate de potassium

2.1 PRINCIPE

Analyse par CLHP-FLD de la teneur en acide aspartique libre après hydrolyse acide.

Le principe consiste à doser par CLHP l'acide aspartique libre après hydrolyse acide du KPA. Cette hydrolyse acide se déroule dans des conditions permettant la dépolymérisation complète du KPA :



potassium polyaspartate aspartic acid

2.2 MATÉRIEL / APPAREILLAGE

2.2.1 Plaque chauffante pour l'hydrolyse acide

2.2.2 Flacons en verre teinté de 4 mL avec bouchon à vis

2.2.3 Balance de précision à 0,1 mg

2.2.4 Fioles jaugées

2.2.5 Système CLHP incluant une pompe quaternaire, un échantillonneur automatique, un thermostat et un détecteur FLD

2.2.6 Colonne C18 (par exemple Syncronis aQ C18, 4,6 x 250 mm ; 5 µm (Thermo))

2.2.7 Dispositif de filtration à membranes de porosité 0,2 µm.

2.3 RÉACTIFS ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Pour l'hydrolyse acide

2.3.1 Solution de métabisulfite de potassium ($Na_2S_2O_2$) (n° Cas 16731-55-8) à une concentration de 10 g/L

2.3.2 Acide chlorhydrique (HCl) 6 M

2.3.3 Hydroxyde de sodium (NaOH) 5 M

2.3.4 Eau bidistillée de résistivité supérieure à 10 mΩ.cm

2.3.5 Polyaspartate de potassium

Pour la préparation de l'échantillon

2.3.6 Acide aminocaproïque ($C_6H_{13}NO_2$, n° CAS : 60-32-2)

2.4 MODE OPÉRATOIRE

Le mode opératoire comporte trois étapes :

- hydrolyse acide à chaud de l'échantillon de polyaspartate de potassium,
- préparation des échantillons pour l'analyse par CLHP-FLD des solutions étalons qui détermineront la concentration en acide aspartique,
- analyse de l'acide aspartique libre après hydrolyse par CLHP (voir annexe 3).

2.4.1 Phase 1 : hydrolyse acide

2.4.1.1 Transférer dans un flacon de 4 mL (2.2.2) :
0,2 mL de solution de métabisulfite de sodium à 10 g/L (2.3.1),
0,5 g de polyaspartate de potassium pesé au mg près,
2 mL d'HCl 6 N (2.3.2).

2.4.1.2 Chauffer à 108 ± 2 °C pendant 72 heures (2.2.1).
Transférer dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 2,4 mL de NaOH 5 M (2.3.3) et compléter avec de l'eau bidistillée (2.3.4).

2.4.2 Phase 2 : préparation de l'échantillon pour analyse CLHP

2.4.2.1 Microfiltrer 5 mL de média (2.4.1.3) à 0,20 µm (2.2.7) dans une fiole jaugée de 20 mL

2.4.2.2 Ajouter 0,2 mL d'étalon interne (acide aminocaproïque) (2.3.6)

2.4.2.3 Compléter avec de l'eau bidistillée.

2.4.3 Phase 3 : Analyse des échantillons par CLHP (voir annexe 3)

CALCULS

La concentration en polyaspartate (KPA) est calculée de la manière suivante :

KPA (mg/L) = (acide aspartique hydrolysé – acide aspartique libre avant l'hydrolyse) x f_{KPA}

où f_{KAP} = 1,15 est le facteur de conversion du KPA en acide aspartique, calculé à partir du rapport entre la masse moléculaire du monomère de KPA (MM moyenne des monomères de KPA A5DK SD = 154) et la masse moléculaire de l'acide aspartique (133,1), conformément à l'équation :

$$f_{KPA} = \frac{MM_{monomère_KPA}}{MM_{acide_aspartique}} = 1{,}15$$

où l'acide aspartique libre est déterminé selon l'annexe 3.

ANNEXE 3

3. Dosage de l'acide aspartique libre

3.1 PRINCIPE

Le dosage de l'acide aspartique dans le polyaspartate de potassium tel qu'il a été produit est réalisé par CLHP couplée à une détection fluorimétrique (FLD), après dérivation de l'acide aspartique avec l'ortho-phthalaldéhyde (OPA). Le dosage du potassium est réalisé par l'intermédiaire d'une courbe d'étalonnage obtenue en injectant les solutions étalons de référence.

3.2 MATÉRIEL / APPAREILLAGE

3.2.1 Fioles jaugées

3.2.2 Système CLHP incluant une pompe quaternaire, un échantillonneur automatique, un thermostat et un détecteur FLD

3.2.3 Colonne C18, par exemple Syncronis aQ C18 4,6 x 250 mm ; 5 µm.

3.3 RÉACTIFS

3.3.1 Acide aspartique (acide D,L-aspartique, $C_4H_7NO_4 \geq 99$ %, n° CAS : 617-45-8)

3.3.2 Solution 1 : acide aspartique à 8000 mg/L dans de l'eau bidistillée

3.3.3 Solution 2 : acide aspartique à 200 mg/L dans de l'eau bidistillée

3.3.4 Acide aminocaproïque ($C_6H_{13}NO_2$, n° CAS : 60-32-2)

3.3.5 Solution mère d'acide aminocaproïque à 1000 mg/L dans de l'eau bidistillée

3.3.6 Solutions d'étalonnage préparées par dilution de la solution 1 (point 3.3.2) et de la solution 2 (3.3.3), dont les valeurs de référence sont indiquées ci-après :

	ÉT 1	**ÉT 2**	**ÉT 3**	**ÉT 4**	**ÉT 5**	**ÉT 6**
mL H_2O	18,8	19,0	15,0	19,750	19,375	18,750
mL Solution 1	-	-	-	0,250	0,625	1,250
mL Solution 2	0,2	1,0	5,0	-	-	-
Acide aspartique (mg/L)	**2**	**10**	**50**	**100**	**250**	**500**

3.3.7 Méthanol pour CLHP

3.3.8 Tétrahydrofurane pour CLHP
3.3.9 Acétate de sodium anhydre (*n*° CAS : 127-09-3)
3.3.10 Acétonitrile (CH_3CN) pour CLHP
3.3.11 Tétraborate de sodium décahydraté ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, n° CAS : 1303-96-4)
3.3.12 O-phtalaldéhyde (OPA) : ($C_8H_6O_2 \geq 99\%$, n° CAS : 643-79-8)
3.3.13 Mercaptoéthanol : ($C_8H_6OS \geq 99$ %, n° CAS : 60-24-2)
3.3.14 Eau bidistillée de résistivité supérieure à 10 MΩ.cm
3.3.15 Solution de dérivation : dans une fiole jaugée de 10 mL, introduire 100 mg d'OPA, 200 µL de mercaptoéthanol, 1 mL de méthanol et compléter avec une solution tampon à pH 10,5 de tétraborate de sodium décahydraté 0,1 M.

La solution doit être préparée juste avant utilisation car elle se dégrade dans la journée suivant sa préparation.

3.4 PHASES MOBILES

3.4.1 [canal A] : eau ultra-pure
3.4.2 [canal B] : tampon acétate de sodium 0,05 M/tétrahydrofurane (96:4 ; v/v)
3.4.3 [canal C] : méthanol
3.4.4 [canal D] : acétonitrile

3.5 MODE OPÉRATOIRE

La méthode comporte une réaction de dérivation de l'acide aspartique avec l'o-phtalaldéhyde (OPA) ; le taux de recouvrement pour ce processus est de 100 %.
Les paramètres instrumentaux sont indiqués ci-après :
- température de la colonne : 40° C,
- longueur d'onde (λ) : FLD Ex 340 nm, Em 450 nm,
- la séparation est réalisée en mode gradient (voir le point 3.4, Phases mobiles) :

Temps (min)	% B	% C	% D	Débit (mL/min)
0,00	100,0	0,0	0,0	1,1
3,00	100,0	0,0	0,0	1,1
15,00	50,0	25,0	25,0	1,1
17,00	84,0	8,0	8,0	1,1
18,00	100,0	0,0	0,0	1,1
Temps d'exécution : 21 min + 2 min de temps d'arrêt				

3.5.1 Préparer les solutions d'étalonnage en mélangeant 5,0 mL de la solution étalon (3.3.6) et 0,2 mL de la solution d'étalon interne (3.3.5) dans une fiole jaugée de 20 mL, puis compléter avec de l'eau bidistillée et agiter.

3.5.2 Diluer 5,0 µL d'échantillon (annexe 2, point 2.4.2) avec 20 µL de méthanol, puis dériver avec 0,5 µL d'OPA. Mélanger dix fois 10,0 µL de la solution obtenue dans l'injecteur, puis injecter après 0,5 min.

3.5.3 Si les résultats excèdent la limite supérieure de la courbe d'étalonnage, diluer l'échantillon et répéter la procédure analytique.

3.6 CALCULS

La concentration de l'acide aspartique dans l'échantillon, exprimée en mg/L, est obtenue en appliquant la formule suivante :

$Y = A \cdot f \cdot d$

où :

Y : concentration en acide aspartique dans l'échantillon, en mg/L,

A : aire du pic du chromatogramme,

f : facteur de réponse du pic du chromatogramme,

d : facteur de dilution.

ANNEXE 4

Méthode de détermination de la masse moléculaire moyenne du polyaspartate de potassium

1. Introduction

L'efficacité du polyaspartate de potassium dans la stabilisation tartrique dépend de la masse moléculaire moyenne, et il s'avère donc nécessaire de disposer d'une méthode de détermination.

2. Objectif

Paramètre à déterminer : masse moléculaire moyenne, exprimée en g/mol.

3. Définitions

GPC/SEC : chromatographie par perméation sur gel.

4. Principe

La détermination de la masse moléculaire moyenne nécessite une chromatographie par perméation sur gel (GPC/SEC). Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion moléculaire utilisée pour séparer les molécules selon leur dimension.

5. Réactifs et matériel

5.1 Eau **bidistillée** de résistivité supérieure à 10 MΩ.cm à 25°C.
5.2 Sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) de pureté ≥ 99 % (CAS 7757-82-6).
5.3 Phosphate de potassium monobasique anhydre (KH_2PO_4) de pureté ≥ 99 % (CAS 7787-77-0).
5.4 Azoture de sodium de pureté ≥ 99% (CAS 26628-22-8). L'utilisation d'azoture de sodium doit être soumis à mesure de prévention pour risque toxique et instabilité (explosif).
5.5 Sels de sodium de l'acide polyacrylique de masse moléculaire comprise entre 1000 et 1250 g/mol (CAS 9003-04-7).
5.6 Acide L-aspartique de pureté ≥ 98 % (CAS 56-84-8).
5.7 Polyaspartate de potassium de pureté ≥ 98 % (CAS 64723-18-8).

6. Appareillage

6.1 Dispositif de filtration de porosité 0,22 µm
6.2 Colonne pour GPC/SEC adaptée à des intervalles de masse moléculaire compris entre 500 et 10 000 g/mol
6.3 Détecteur UV

7. Préparation de l'échantillon

Préparer un volume d'environ 15 mL de la solution de polyaspartate de potassium à 0,1 % (5.7) dans la phase mobile (8.1) et la filtrer sur un filtre de 0,22 µm (6.1). La solution de polyaspartate dans le tampon devient instable au bout de 3 heures. Il convient donc de préparer des solutions fraîches avant chaque injection.

7.1 Étalonnage

Préparer des solutions à 0,1 % pour chaque étalon (5.5 et 5.6) dans la phase mobile (8.1).
Les étalons utilisés sont injectés par masses moléculaires décroissantes.
La courbe d'étalonnage s'obtient en représentant sur un graphique le temps de rétention (variable x) en fonction du logarithme de la masse moléculaire moyenne des étalons (5.5.) (variable y). ($r2 \geq 0,99$).

8. Mode opératoire

8.1 Préparation de la phase mobile

La phase mobile est une solution tampon composée de Na2SO4 à 0,1 M (14,2 g/L) (5.2), KH2PO4 à 0,01 M (1,36 g/L) (5.3) et 20 mg/L d'azoture de sodium (5.4) dans de l'eau bidistillée (5.1) filtrée en utilisant un filtre de 0,22 µm. La solution tampon doit être utilisée dans les 4 jours suivant la préparation.

8.2 Conditions de chromatographie

- Débit : 0,7 mL/min
- Colonne : Ultrahydrogel Linear TM ou similaire, de dimensions : 7,8*300 mm, contenant des particules possédant un diamètre moyen de 6 µm
- Température de la colonne : 50 °C
- Temps de passage : 40 min
- Volume d'injection : 200 µL
- Détecteur UV : longueur d'onde de 220 nm

9. Calculs

Le profil chromatographique correspondant au passage de l'échantillon est comparé avec celui des étalons (5.5). La masse moléculaire du polyaspartate, exprimée en g/mol, est calculée en fonction du temps de rétention de l'échantillon et de la courbe d'étalonnage.

POTASSIUM (ALGINATE DE)
Kalii Alginas
N° SIN: 402
(Oeno 33/2000, Oeno 410/2010)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Sel de potassium de l'acide alginique, extrait de diverses algues phéophycées, surtout les laminaires, par digestion alcaline et purification.

Produit clarifiant utilisé au cours de la seconde fermentation en bouteille des vins mousseux.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté et les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

L'alginate de potassium est une poudre blanche ou jaunâtre, à peu près inodore et insipide, qui se présente, au microscope, composée de fragments de fibres.

Il donne avec l'eau une solution visqueuse. Le pH de cette solution est généralement compris entre 6 et 8. Il est insoluble dans l'alcool fort et dans la plupart des solvants organiques.

Il se forme un précipité gélatineux d'alginate de calcium si à 5 ml d'une solution aqueuse à 1 p. 100 d'alginate de potassium (m/v) on ajoute 0,50 ml de solution de chlorure de calcium à 20 p. 100 (R),

Il se forme un précipité gélatineux d'acide alginique si à 10 ml de solution aqueuse à 1 p. 100 (m/v) d'alginate de potassium, on ajoute 1 ml d'acide sulfurique dilué à 10 p. 100 (R),

4. ESSAIS

4.1 Amidon

A 5 ml de solution aqueuse à 1 p. 100 (m/v) d'alginate de potassium, ajouter 5 ml d'eau iodée (R); il ne doit pas se produire de coloration bleue.

4.2 Gélatine

A 10 ml de solution aqueuse à 1 p. 100 (m/v) d'alginate de potassium, ajouter 1 ml de solution chaude de tanin à 2 p. 100 (R) : il ne doit pas se produire de précipité.

4.3 Perte à la dessiccation

Déterminée jusqu'à poids constant sur une prise d'essai exactement pesée voisine de 1 g, la perte de poids à 100-105°C de l'alginate de potassium ne doit pas être supérieure à 15 p. 100.

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

4.4 Cendres sulfuriques

Déterminer les cendres sulfuriques, comme il est indiqué en annexe, sur le résidu de l'essai précédent (4.3), le taux des cendres sulfuriques de l'alginate de potassium ne doit pas être supérieur à 40 p. 100.

4.5 Préparation de la solution pour essais

Dans une capsule de silice, calciner un poids d'échantillon correspondant à 2,5 g de produit sec, sans dépasser 550°C. Reprendre le résidu par 10 ml d'eau et 2 ml d'acide nitrique concentré (R). Transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml ; ajouter 2 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (R). Porter à 50 ml avec de l'eau distillée. Filtrer.

4.6 Sulfates

A 2 ml de la solution préparée pour essais (4.5), ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R), porter à 20 ml avec de l'eau distillée et ajouter 2 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R). Le mélange doit être limpide, ou l'opalescence observée après 15 minutes doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en sulfates exprimée en acide sulfurique inférieure à 1 g/kg).

4.7 Chlorures

A 1 ml de la solution préparée pour essais (4.5), ajouter 5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R), 14 ml d'eau distillée et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Si une opalescence se produit, elle doit être moins intense que celle du témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en chlorures exprimée en acide chlorhydrique inférieure à 1 g/kg).

4.8 Fer

2 ml de la solution préparée pour essais (4.5) sont additionnés de 8 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), d'une goutte de solution de permanganate de potassium à 1 p. 100 (R) et de 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R).

Si une coloration rouge apparaît, elle doit être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 3 ml de solution de fer(III) à 0,010 g de fer par litre (R). 7 ml d'eau et les mêmes quantités d'acide chlorhydrique concentré (R) et de solution thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). (Teneur en fer inférieure à 300 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

4.9 Cadmium

Sur la solution préparée pour essais (4.5), doser le cadmium selon la méthode décrite en annexe (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

4.10 Plomb

A partir de la solution pour essais (4.5), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

4.11 Mercure

A partir de la solution pour essais (4.5), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

4.12 Arsenic

A partir de la solution pour essais (4.5), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

4.13 Sodium

Sur la solution préparée pour essais (4.5), doser le sodium par photométrie de flamme. (La teneur en sodium doit être inférieure à 1 p. 100).

1. CONSERVATION

L'alginate de potassium doit être conservé en emballage hermétiquement clos.

CALCIUM (ALGINATE DE)
N° SIN: 402

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'alginate de calcium est obtenu à partir d'une solution aqueuse d'alginate de potassium ou d'acide alginique à 1 pour 100 mis en contact avec une solution aqueuse de chlorure de calcium à 20 pour100. La production de billes d'alginate de calcium s'obtient en laissant tomber des gouttes de solution d'alginate de potassium dans une solution de chlorure de calcium.
Les billes d'alginate de calcium, sèches ou humides, peuvent contenir des levures ou des bactéries lactiques, sèches ou humides. Elles servent à la prise de mousse en bouteille des vins mousseux ou à relancer la fermentation alcoolique des vins tranquilles ou a déclencher la fermentation malolactique.

Ces billes peuvent être recouvertes d'une double couche d'alginate de potassium ou de calcium ou de silice colloïdale afin d'éviter le relargage des levures ou des bactéries incluses.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté et les conditions de sécurité et de conservation de l'alginate de calcium, les levures ou des bactéries incluses dans les billes, la date de péremption et le numéro du lot.

3. CARACTERES

L'alginate de calcium se présente sous forme d'un gel translucide, insoluble dans l'eau et le vin. Il se dissout seulement dans une solution de métaphosphate de sodium.
Il donnera également un précipité d'acide alginique si, à 10 ml de suspension aqueuse d'alginate de calcium à 1 pour100 (m/v), on ajoute 1 ml d'acide sulfurique dilué à 10 pour100 (R).

POTASSIUM (ANHYDROSULFITE DE)
Pyrosulfite de potassium
Disulfite de potassium
Métabisulfite de potassium
Kalii metabisulfis
$K_2S_2O_5$ = 222,3
N° SIN: 224
(Oeno 34/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'anhydrosulfite de potassium, communément appelé métabisulfite de potassium est utilisé pour le dioxyde de soufre qu'il apporte, il se présente sous forme pulvérulente. Il contient 52 à 55 % de son poids en SO_2.
Il existe des limites réglementaires concernant la teneur en dioxyde de soufre des vins.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté du produit et les conditions de conservation et de sécurité.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

Dioxyde de soufre	57,63
Potassium	35,17

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C	454,5 g/l
Alcool à 95 % vol.	insoluble

5. CARACTERES D'IDENTITE

5.1 5 ml de solution aqueuse à 10 p. 100 (m/v) traités par 5 ml de solution d'acide sulfurique diluée à 10 p. 100 (R) dégagent du dioxyde de soufre et réduisent l'iode et le permanganate de potassium.

5.2 La solution aqueuse à 10 p. 100 (m/v) est acide au rouge de méthyle (R) (pH voisin de 5).

5.3 La solution aqueuse à 1 p. 100 (m/v) donne les réactions du potassium.

6. ESSAIS

6.1 Préparation d'une solution pour essais à 10 p. 100

Préparer une solution à 10 p. 100 (m/v)

6.2 Préparation d'une solution pour essais à 1 p. 100

Préparer une solution à 1 p. 100 (m/v) par dilution au dixième de la précédente (6.1).

6.3 Plomb

Sur la solution préparée pour essais à 10 p. 100 (m/v) (6.1), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg.

6.4 Mercure

Sur la solution préparée pour essais à 10 p. 100 (m/v) (6.1), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.5 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais à 10 p. 100 (m/v) (6.1), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

6.6 Sélénium

Peser 2,60 g d'anhydrosulfite de potassium, quantité qui contient 1,5 g de dioxyde de soufre. Les dissoudre à chaud dans 7 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R). Laisser refroidir et ajouter 3 ml de solution de formaldéhyde (R). Laisser reposer 10 minutes. Placer le tube dans un bain d'eau à 100°C et ajouter 50 mg d'anhydrosulfite de potassium pulvérisé, exempt de sélénium (R) ; laisser le tube dans le bain d'eau à 100°C pendant 15 minutes. Si une coloration rose se développe, elle doit être inférieure à celle présentée par un essai témoin préparé en traitant de la même façon 2,60 g d'anhydrosulfite de potassium exempt de sélénium (R), additionné de 0,45 ml d'une solution de dioxyde de sélénium à 100 mg de sélénium par litre (R). (Teneur en sélénium, rapportée au dioxyde de soufre, inférieure à 10 mg/kg).

6.7 Sodium

Evaporer sur bain d'eau à 100°C, jusqu'à réduction au 1/2, 10 ml de solution préparée pour essais à 1 p. 100 (m/v) (6.2), avec 2 ml d'acide acétique (R).

Verser dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au trait de jauge avec de l'eau. Doser le sodium par photométrie de flamme. (Teneur en sodium inférieure à 2 p. 100.)

6.8 Chlorures

Placer dans une capsule 0,5 ml de solution préparée pour essais à 10 p. 100 (6.1), avec 10 ml d'eau et 3 ml de solution d'acide sulfurique à 10 p. 100 (R) ; évaporer sur un bain d'eau à 100°C en ramenant le volume à 5 ml. Transvaser dans un tube à essai ; porter le volume à 15 ml, ajouter 5 ml d'acide nitrique à 10 p. 100 (R) et 0,5 ml de solution à 5 p. 100 de nitrate d'argent (R). Le liquide doit rester limpide, ou le trouble doit être inférieur à celui présenté par le témoin indiqué en annexe. (Teneur en chlorures exprimée en acide chlorhydrique inférieure à 1 g/kg).

6.9 Fer

Sur la solution préparée pour essais à 10 p. 100 (m/v) (6.1), doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil. (Teneur inférieure à 50 mg/kg de SO_2).

7. DOSAGE

Dioxyde de soufre - Dans une fiole conique de 200 ml, placer 50 ml d'une solution d'éthylènediaminetétracétate disodique à 120 mg par litre, ajouter 10 ml de la solution d'anhydrosulfite de potassium à 1 p. 100 fraîchement préparée et titrer par l'iode 0,05 M. Soit **n** ml le volume employé, 1 ml de solution d'iode 0,05 M correspond à 3,2 mg de dioxyde de soufre.

Teneur en dioxyde de soufre pour 100 g : 3,2 n.

L'anhydrosulfite de potassium doit contenir au moins 51.8 p. 100 de dioxyde de soufre.

8. CONSERVATION

Ce produit, étant altérable à l'air, doit être conservé dans un récipient hermétiquement clos.

CARBONATE DE POTASSIUM

AG 8/78-OEN

OIV-OENO 579/2018

Carbonate de potassium anhydre (K_2CO_3, n° CAS : 584-08-7) Carbonate de potassium hydratée ($2K_2CO_3 \times 3H_2O$, n° CAS : 6381-79-9)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'addition de carbonate de potassium peut être utilisée pour la désacidification des moûts et des vins.

2. ÉTIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté du produit, le numéro de lot, la date de fabrication, les conditions de conservation ainsi que la date limite d'utilisation.

3. CARACTÈRES

Le carbonate de potassium anhydre (K_2CO_3) correspond au sel de potassium de l'acide carbonique et se présente sous forme d'une poudre blanche, inodore et hygroscopique. La forme hydratée ($2K_2CO_3 \times 3H_2O$) se présente sous forme de petits cristaux ou de granules blancs et translucides.

4. CARACTÈRES D'IDENTITÉ

4.1 Solubilité : très soluble dans l'eau, insoluble dans l'éthanol (95 % vol.).

4.2 Carbonate : le carbonate de potassium est soluble avec effervescence dans les solutions diluées des acides acétique ou chlorhydrique, émettant un gaz incolore (CO_2) qui, à son passage par la solution d'hydroxyde de calcium, produit immédiatement un précipité blanc.

4.3 Potassium : la présence de potassium confère à une flamme non lumineuse une couleur violette, si cette dernière n'est pas masquée par la présence de petites quantités de sodium.

5. ESSAIS

Les limites sont déterminées en fonction des valeurs observées lors de la production selon les bonnes pratiques de fabrication.

5.1. Perte à la dessiccation

Par dessiccation de 3 g de carbonate de potassium à 180 °C pendant 4 heures, la perte en poids doit être inférieure à 1 % pour la forme anhydre, et située entre 10 et 16,5 % pour la forme hydratée.

5.2. Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 1 g de carbonate de potassium dans 20 mL d'eau.

5.3. Matières insolubles dans l'eau

Filtrer la solution préparée pour essais (5.2) sur une membrane en ester de cellulose de diamètre de pores inférieur ou égal à 0,5 µm ; aucun résidu ne doit être détecté.

5.4. Fer

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le fer selon la méthode de spectrométrie d'absorption atomique décrite au chapitre II du *Codex œnologique international ;* la teneur en fer doit être inférieure à 10 mg/kg.

5.5. Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le plomb selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international ;* la teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

5.6. Mercure

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international ;* la teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.7. Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser l'arsenic selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international ;* la teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

5.8. Sodium

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le sodium par photométrie de flamme selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international ;* la teneur en sodium doit être inférieure à 1 %.

5.9. Cadmium

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international ;* la teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/l.

5.10. Teneur en carbonate de potassium

Échantillon : 1 g préalablement déshydraté.

Analyses : transférer l'échantillon dans un bécher et le dissoudre dans 50 ml d'eau. Ajouter 2 gouttes de solution d'indicateur de rouge de méthyle puis, sous agitation constante, titrer lentement avec de l'acide chlorhydrique 1 N jusqu'à ce que la solution vire légèrement au rose. Chauffer la solution jusqu'à ébullition, la laisser refroidir, puis poursuivre le titrage jusqu'à ce que la couleur légèrement rosée ne disparaisse plus après ébullition. Le produit destiné aux applications œnologiques doit contenir au minimum 98 % de carbonate de potassium.

6. CONSERVATION

Le carbonate de potassium doit être stocké en récipients étanches.

POTASSIUM (CASEINATE DE)
(Oeno 35/2000, Oeno 673-2021)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le caséinate de potassium est obtenu à partir de lait écrémé, frais et/ou pasteurisé, par coagulation acide de la caséine (voir cette monographie), neutralisation par de l'hydroxyde de potassium et séchage par atomisation. Il est utilisé pour le collage des vins.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté et les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

Le caséinate de potassium se présente sous forme d'une poudre blanche légèrement jaunâtre avec une odeur typique due aux protéines du lait mais sans saveur ni odeur anormale. Dans l'eau, il donne une solution colloïdale.

4. ESSAIS

4.1 pH

En solution dans l'eau à raison de 5 g de caséinate de potassium pour 100 mL d'eau, le pH doit être compris entre 6,0 et 8,0 ± 0,5.

4.2 Perte à la dessiccation

Déterminée jusqu'à poids constant sur une prise d'essai voisine de 2 g, la perte de poids à 100-105 °C ne doit pas être supérieure à 10 %.

Toutes les limites fixées ci-après sont rapportées au produit sec.

4.3 Cendres

Incinérer sans dépasser 550 °C, le résidu de la détermination de la perte à la dessiccation, le poids de cendres ne doit pas être supérieur à 7 %.

4.4 Préparation de la solution pour essais

Après pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau. Chauffer pour activer la dissolution et compléter à 50 ml avec de l'eau.

4.5 Potassium

Sur la solution préparée pour essais (4.4), doser le potassium par photométrie de flamme (teneur en potassium non supérieure à 2 p. 100).

4.6 Fer

Sur la solution préparée pour essais (4.4), doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique (Teneur en fer inférieure à 200 mg/kg).

4.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (4.4), effectuer le dosage du plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

4.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (4.4), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

4.9 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (4.4), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

4.10 Azote total

Introduire environ 0,20 g de caséinate de potassium exactement pesé dans un matras de minéralisation avec 15 ml d'acide sulfurique concentré (R), 2 g de catalyseur de minéralisation (R) et poursuivre l'opération selon la méthode décrite en annexe. La teneur en azote total ne doit pas être inférieure à 13 p. 100.

4.11 Matière Grasse

La teneur en matière grasse mesurée selon la méthode décrite en annexe, ne devra pas depasser 2 p. 100 en poids.

5. CONSERVATION

Le caséinate de potassium doit être conservé en récipients étanches, par exemple conditionné en sacs de papier doublés de polyéthylène, à une température comprise entre 5 et 20°C et avec une humidité relative inférieure à 65 p. 100. La durée de conservation du caséinate de potassium est de 24 mois.

POTASSIUM (D,L-TARTRATE DE)
Potassium (D,L-2,3-dihydroxybutanedioate de)
Racémate de potassium
COOK - CHOH - CHOH - COOK = 226,3
(Oeno 42/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Sel destiné à la désacidification des moûts et des vins et à éliminer l'excès de calcium.

Son emploi est soumis au respect de certaine règles.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté du produit et les conditions de sécurité et de conservation. Elle doit aussi clairement indiquer qu'il s'agit du mélange racémique des deux isomères D et L de l'acide tartrique afin de ne pas laisser supposer qu'il s'agit de l'acide L-tartrique naturel du raisin.

3. CARACTERES

Il s'agit du sel dipotassique de l'acide D,L-tartrique ou acide tartrique racémique $K_2C_4H_4O_6$.

Il se présente sous forme de cristaux blancs ou de poudre granulée blanche, très soluble dans l'eau.

4. ESSAIS

4.1 Perte à la dessiccation (matières volatiles)

Après 4 heures de dessiccation à l'étuve à 105°C, la perte de poids ne doit pas être supérieure à 1 p. 100.

4.2 Préparation de la solution pour essais

Dans une fiole jaugée de 100 ml, placer 10 grammes de racémate de potassium et compléter au trait de jauge avec de l'eau.

Sur cette solution effectuer les mêmes essais que ceux figurant à la monographie du tartrate neutre de potassium, y compris le sodium, et appliquer les mêmes limites.

4.3 Distinction d'avec le tartrate neutre de potassium

Pratiquer comme il est indiqué dans la monographie du tartrate neutre de potassium ; il doit se produire instantanément un précipité cristallin blanc.

4.4 Plomb

Doser le plomb selon la méthode décrite en annexe. Teneur inférieure à 5 mg/kg.

4.5 Mercure

Doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. Teneur inférieure à 1 mg/kg.

4.6 Arsenic

Doser l'arsenic mercure selon la méthode décrite en annexe. Teneur inférieure à 3 mg/kg.

4.7 Oxalate

Sur la solution préparée pour essais (4.2), doser l'oxalate selon la méthode décrite en annexe. (Teneur, exprimée en acide oxalique, inférieure à 100 mg/kg).

5. CONSERVATION

Le tartrate de potassium doit être conservé dans un récipient hermétiquement clos.

POTASSIUM (HEXACYANOFERRATE(II) DE)
Potassium (Ferrocyanure de)
Cianuretum ferroso - Kalium
K_4 [$Fe(CN)_6$], $3H_2O$ = 422,40
N° SIN: 536
(Oeno 36/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'hexacyanoferrate(II) de potassium se présente sous forme de cristaux monocliniques jaunes, inodores, de saveur à la fois salée et amère, de densité 1,935 à 20°C.

Ce sel, légèrement efflorescent, commence à perdre son eau de cristallisation vers 60°C et se déshydrate complètement à l'étuve à 100°C en devenant blanc et hygroscopique.

Les solutions aqueuses fraîchement préparées sont colorées en jaune, elles s'altèrent lentement à la lumière avec libération d'alcalinité et prennent une couleur verdâtre par formation d'une petite quantité de bleu de Prusse.

L'hexacyanoferrate(II) de potassium utilisé pour éliminer les ions fer (III) et fer(II) dans les vins susceptibles de provoquer la casse ferrique mais aussi pour éviter la casse cuivreuse et plus généralement pour diminuer la teneur en métaux lourds.

Son emploi est soumis à un contrôle rigoureux obligatoire.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté, les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES D'IDENTITE

La solution aqueuse à 1 p. 100 (m/v) donne les réactions des ions hexacyanoferrate(II) et potassium ; en particulier, avec le cation fer(III) elle donne un précipité bleu foncé d'hexacyanoferrate(II) de fer(III) (bleu de Prusse) insoluble dans les acides minéraux dilués et avec le cation cuivre, un précipité pourpre d'hexacyanoferrate(II) de cuivre(II) insoluble dans les acides minéraux dilués.

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C	265 g/l
Eau à 100°C	740 g/l

5. ESSAIS

5.1 Perte à la dessiccation

Placer 1 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium pulvérisé dans une capsule tarée et dessécher à l'étuve à l00° C jusqu'à poids constant. La perte de poids doit être comprise entre 12 et 13 p. 100

5.2 Produits insolubles

Dissoudre 10 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium dans 100 ml d'eau. La solution doit être limpide.

5.3 Préparation de la solution pour essais

Dans une capsule de silice, calciner 1 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium, sans dépasser 550°C. Reprendre le résidu par 10 ml d'eau et 2 ml d'acide nitrique concentré (R). Transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml ; ajouter 5 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (R). Porter à 50 ml avec de l'eau distillée, filtrer.

5.4 Chlorures

A 2,5 ml de la solution pour essais (5.3), ajouter 5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R), 12,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Si une opalescence se produit, elle doit être moins intense que celle du témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en chlorures exprimée en acide chlorhydrique, inférieure à 1 g/kg).

5.5 Sulfates

A 5 ml de la solution préparée pour essais (5.3), ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R), porter à 20 ml avec de l'eau distillée et ajouter 2 ml de solution de chlorure de baryum (R). Le mélange doit être limpide ou l'opalescence observée après 15 minutes doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en sulfates exprimée en acide sulfurique inférieure à 1 g/kg).

5.6 Sulfures

Dans le ballon de 100 ml d'un appareil à distiller muni d'une petite colonne rectificatrice ou de tout autre dispositif antiprimage (destiné à éviter le passage direct de parties liquides du ballon dans le distillat), dissoudre 1 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium dans 10 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R) et 10 ml d'eau distillée. Distiller et Recueillir 5 ml de distillat dans 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium 1 M.

Prélever 0,5 ml de ce distillat et ajouter 18,0 ml d'eau distillée et 1 ml d'une solution de nitrate de plomb à 1 g par litre (R). La coloration brune obtenue doit être inférieure à celle du témoin préparé en ajoutant à 0,5 ml d'une solution d'acide sulfhydrique à 10 mg de soufre par litre (R), 18 ml d'eau distillée et 1 ml d'une

solution de nitrate de plomb à 1 g par litre (R). (Teneur en sulfures, exprimée en soufre, inférieure à 100 mg/kg).

5.7 Cyanures

Dans une fiole jaugée de 40 ml contenant 25 ml d'eau distillée et 2,5 ml de solution tampon de pH 7,5 (R), introduire 40 mg d'hexacyanoferrate(II) de potassium. Après dissolution, ajouter aussitôt 0,3 ml de solution de chloramine T à 0,1 p. 100 (R). Attendre 90 secondes et ajouter 6 ml de réactif pyridine-pyrazolone (R).

Compléter à 40 ml avec de l'eau distillée et mélanger. La coloration obtenue ne doit pas être plus intense que celle obtenue en traitant de la même façon 4 ml d'une solution fraîchement préparée de cyanure de potassium titrant 1 mg d'acide cyanhydrique par litre (R). (Teneur en cyanures libres exprimée en acide cyanhydrique, inférieure à 100 mg/kg).

5.8 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

5.9 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

5.10 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe (Teneur en arsenic inférieure à 3 mg/kg).

5.11 Ammoniac

Dans le ballon d'un appareil à distiller, placer 2 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium, 25 ml d'eau distillée et 5 ml d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 (R). Distiller et Recueillir 20 ml de distillat dans 40 ml d'acide borique à 4 p. 100 (R) en présence de rouge de méthyle ; 1,2 ml de solution d'acide chlorhydrique 0,1 M doivent suffire pour faire virer l'indicateur. (Teneur en ammoniac inférieure à 100 mg/kg).

6. CONSERVATION

L'hexacyanoferrate(II) de potassium doit être conservé dans des sacs étanches à l'abri de l'humidité.

POTASSIUM (HYDROGENOCARBONATE DE)
Bicarbonate de potassium
$KHCO_3$ = 100,1
(Oeno 37/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit utilisé pour la désacidification des moûts et des vins. L'apport d'ions potassium provoque la salification de l'acide tartrique libre avec formation d'hydrogénotartrate de potassium.

L'utilisation de ce produit est soumise à réglementation.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté et les conditions de sécurité et de conservation.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

Dioxyde de carbone	43,97
Potassium	39,06

4. CARACTERES

L'hydrogénocarbonate de potassium se présente sous forme d'une poudre blanche, inodore, légèrement hygroscopique. Elle donne les réactions des carbonates.

5. SOLUBILITE

Eau à 20°C 600 g/l

Insoluble dans l'alcool à 95 % vol.

Soluble avec effervescence dans les solutions diluées d'acides (acétique, chlorhydrique...).

6. ESSAIS

6.1 Perte à la dessiccation

Après 4 heures de dessiccation dans une étuve à 105°C, la perte de poids ne doit pas être supérieure à 2 p. 100.

6.2 Préparation de la solution pour essais.

Placer 10 g d'hydrogénocarbonate de potassium dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau.

6.3 Matières insolubles dans l'eau

Filtrer la solution préparée pour essais (6.2). Le résidu séché à 105°C puis calciné à 550°C ne doit pas être supérieur à 0,1 g (soit 1 p. 100).

6.4 Fer

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser le fer selon la méthode de spectrométrie d'absorption atomique figurant au Recueil. (Teneur en fer inférieure à 100 mg/kg).

6.5 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieur à 5 mg/kg).

6.6 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.7 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

6.8 Sodium

Sur la solution préparée pour essais (6.2), doser le sodium par photométrie de flamme. (Teneur en sodium inférieure à 1 p. 100).

6.9 Teneur en hydrogénocarbonate de potassium

Dissoudre dans 50 ml de solution d'acide chlorhydrique 1 M une prise d'essai exactement pesée voisine de 2 g. Titrer l'acide chlorhydrique en excès à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 1 M en présence de rouge de méthyle (R).

Le produit oenologique doit contenir au minimum 98 p. 100 d'hydrogénocarbonate de potassium.

7. CONSERVATION

L'hydrogénocarbonate de potassium doit être conservé dans des sacs étanches à l'abri de l'humidité.

POTASSIUM (HYDROGENOSULFITE)
Bisulfite de potassium
Sulfite acide de potassium
KH SO_3 = 120,2
N° SIN: 228
(Oeno 38/2000, Oeno 646-2019)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'hydrogénosulfite de potassium est utilisé en raison du taux de dioxyde de soufre qu'il contient.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner le poids de dioxyde de soufre par litre ou par kilogramme et les conditions de conservation et de sécurité.

Il existe des limites réglementaires concernant la teneur des vins en dioxyde de soufre.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

SO_2	53,30
K	32,53

4. CARACTERES

Se présente sous forme de solution incolore ou très légèrement jaunâtre obtenue par passage d'un courant de dioxyde de soufre dans une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium.

Les solutions d'hydrogénosulfite sont instables et ne doivent pas contenir moins de 70 g/L ou plus de 200 g/L de SO_2.

5. CARACTERES D'IDENTITE

Les solutions d'hydrogénosulfite de potassium donnent les réactions du potassium et du dioxyde de soufre et sont légèrement acides (pH voisin de 5).

6. ESSAIS

Les essais sont identiques à ceux figurant à la monographie de l'anhydrosulfite de potassium de même que les teneurs limites pour le plomb, le mercure, le fer, l'arsenic, le sélénium, le sodium et les chlorures.

7. DOSAGE

Dans une fiole conique de 200 ml placer 50 ml d'eau froide puis ajouter 5 ml de la solution d'hydrogénosulfite de potassium, diluer de façon à avoir environ une solution à 1 p. 100 de SO_2 et titrer par l'iode 0,1 M en présence d'empois d'amidon. Soit *n* ml le volume d'iode utilisé

La teneur en dioxyde de soufre (SO_2) de la solution exprimée en p. 100 (m/v) est de : 0,64 . *n* (elle ne peut être inférieure à 70 g/L).

8. CONSERVATION

Les solutions d'hydrogénosulfite de potassium contenant plus de 15 p. 100 (m/v) de dioxyde de soufre ne doivent pas être conservées à basse température afin d'éviter tout risque de cristallisation.

POTASSIUM (HYDROGENOTARTRATE DE)
Potassium (L-2,3-dihydroxy-hydrogénobutanedioate de)
Tartrate monopotassique
Bitartrate de potassium
COOH - CHOH - CHOH - COOK = 188,17
N° SIN: 336 i
(Oeno 39/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'addition d'hydrogénotartrate de potassium, communément appelé bitartrate de potassium, favorise la cristallisation des sels de l'acide tartrique lors du traitement du vins par le froid.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté du produit, sa granulométrie et les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

Il s'agit du sel monopotassique anhydre de l'acide L(+)tartrique $C_4 H_5O_6K$.

Il se présente sous forme de cristaux blancs ou de poudre granulée blanche de saveur légèrement acide.

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C 5,2 g/l
Eau à 100°C 61 g/l
Insoluble dans l'alcool

5. ESSAIS

5.1 Perte à la dessiccation (matières volatiles)

Après 4 heures de dessiccation à l'étuve à 105°C, la perte de poids ne doit pas être supérieure à 1 p. 100.

5.2 Préparation de la solution pour essais.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, placer 10 grammes d'hydrogénotartrate de potassium, 50 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Agiter et compléter au trait de jauge avec de l'eau.

Sur cette solution, effectuer les mêmes essais que ceux figurant à la monographie de l'acide L(+)tartrique, à l'exception des chlorures et appliquer les mêmes limites.

5.3 Sodium

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le sodium par photométrie de flamme. Selon la méthode du Recueil. (Teneur en sodium inférieure à 1 p. 100).

5.4 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (5.2), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge obtenue ne devra pas être plus intense que celle d'un témoin préparé avec 1 ml d'une solution de sel de fer(III) à 0,010 g de fer par litre (R), 9 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur inférieure à 10 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

5.5 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

5.6 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

5.7 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

5.8 Oxalate

Sur la solution préparée pour essais (5.2), doser l'oxalate selon la méthode décrite en annexe (Teneur, exprimée en acide oxalique, inférieure à 100 mg/kg).

6. CONSERVATION

L'hydrogénotartrate de potassium doit être conservé dans un récipient hermétiquement clos.

POTASSIUM (SORBATE DE)
Potassium (hexa-2,4-diènoate de)
Kalii sorbas
CH_3 - CH = CH-CH = CH - COOK
$C_6H_7O_2K$ = 150,2
N° SIN: 202
(Oeno 40/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le sorbate de potassium est un agent conservateur, il libère 74 % d'acide sorbique dont les propriétés antifongiques inhibent le développement des levures. Son emploi est limité L'acide sorbique n'est pas bactéricide, il est métabolisé par certaines bactéries et donne des goûts de "géranium" caractéristiques.
Pour cette raison, sa présence dans les vins ne permet pas de supprimer le SO2.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté du produit, sa teneur en acide sorbique et les conditions de sécurité et de conservation.

3. COMPOSITION CENTESIMALE

Acide sorbique	74,64
Potassium	26,03

4. SOLUBILITE

Eau	très soluble
Alcool à 95 % vol.	peu soluble (≅ 14 g/l)
Ether éthylique	insoluble

5. CARACTERES D'IDENTITE

5.1 Poudre blanche ou granulés solubles dans l'eau, solution neutre à la phénolphtaléine (R), alcaline au rouge de méthyle (R).

5.2 Agiter 20 mg de sorbate de potassium avec 1 ml d'eau de brome (R) et 1 goutte d'acide acétique (R). La couleur doit disparaître.

5.3 Une solution contenant 5 mg de sorbate de potassium par litre d'eau présente une bande d'absorption à 256 nm.

5.4 La solution aqueuse à 10 p. 100 précipite par les acides et présente les caractères du potassium.

6. ESSAIS

6.1 Solubilité

Vérifier la solubilité complète dans l'eau et l'alcool.

6.2 Perte à la dessiccation

1 g de sorbate de potassium placé dans une étuve à 105°C ne doit pas perdre plus de 1 p. 100 de son poids en 3 heures.

6.3 Préparation de la solution pour essais

Dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre 1 g de sorbate de potassium dans 40 ml d'eau, ajouter 0,5 ml d'acide nitrique concentré (R), porter au trait de jauge et filtrer.

6.4 Chlorures

A 2,5 ml de la solution préparée pour essais (6.3), ajouter 0,5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R), 17 ml d'eau et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). L'opalescence doit être inférieure à celle du témoin obtenu suivant la technique indiquée en annexe. (Teneur en chlorures, exprimée en acide chlorhydrique, inférieure à 1 g/kg).

6.5 Sulfates

A 5 ml de la solution préparée pour essais (6.3), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (R), 14 ml d'eau et 2 ml de solution de chlorure de baryum (R). Le mélange doit être limpide, ou l'opalescence observée après 15 minutes doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en sulfates, exprimée en acide sulfurique, inférieure à 1 g/kg).

6.6 Métaux lourds

Dissoudre 1 g de sorbate de potassium dans 15 ml d'eau ; ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R) et 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Le mélange doit rester incolore ou être moins coloré que la solution de 1 g du même sorbate de potassium dans 15 ml d'eau. S'il y a une augmentation de la couleur, celle-ci doit être au plus égale à celle du témoin, contenant 20 µg de plomb. Pour cette comparaison, utiliser le même dispositif que celui décrit pour l'acide sorbique. (Teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

6.7 Plomb

A partir de la solution pour essais (6.3), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

6.8 Mercure

A partir de la solution pour essais (6.3), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.9 Arsenic

A partir de la solution pour essais (6.3), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

6.10 Recherche des aldéhydes

A 2,5 ml de la solution préparée pour essais (6.3), ajouter 0,5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R), 17 ml d'eau, traiter 1 ml de cette solution avec 0,5 ml de solution de fuchsine décolorée par l'acide sulfureux (R) et comparer après 15 minutes à un tube témoin obtenu avec 0,5 ml du même réactif et 1 ml de formaldéhyde en solution à 20 µg par millilitre. La coloration devra être moins intense que celle du témoin. (Teneur en aldéhydes, exprimée en formaldéhyde, inférieure à 1 g/kg).

6.11 Dosage

Ce dosage doit être fait avec le produit à analyser préalablement desséché dans un dessiccateur à acide sulfurique durant 24 heures.

Introduire un poids **p** (en g) du produit desséché voisin de 0,2 g dans le barboteur d'un appareil à entraînement par la vapeur d'eau, avec 1 g d'acide tartrique et 10 ml d'eau. Distiller 250 ml au moins (jusqu'à ce que la vapeur n'entraîne plus d'acide). Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M l'acidité distillée : soit **n** le nombre de millilitres versés. 1 ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M correspond à 0,01502 g de sorbate de potassium.

Teneur p. 100 en sorbate de potassium du produit essayé

$$\frac{1{,}502\ \mathbf{n}}{\mathbf{p}}$$

Le sorbate de potassium analysé doit titrer 98 p. 100 au moins rapporté au produit desséché.

7. CONSERVATION

Le sorbate de potassium doit être conservé en récipient étanche à l'abri de la lumière afin de ralentir son oxydation.

POTASSIUM (L(+)-TARTRATE DE)
Potassium (L-2,3-dihydroxybutanedioate de)
Tartrate dipotassique
Tartrate neutre de potassium
COOK - CHOH - CHOH - COOK, $(H_2O)_{1/2}$ = 235,3
N° SIN: 336 ii

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le L-tartrate dipotassique est destiné à la désacidification des moûts et des vins.
Son emploi est soumis au respect des restrictions réglementaires en vigueur dans certains pays.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté du produit (supérieure ou égale à 99% du produit rapporté au poids sec), les conditions de sécurité et de conservation et le fait que la désacidification des vins est soumise à certaines conditions.

3. CARACTERES

Il s'agit du sel dipotassique de l'acide L-tartrique (pouvoir rotatoire positif, quelquefois noté L(+)Tartrique) qui cristallise avec une demi-molécule d'eau :

$C_4H_4O_6K_2$, $(H_2O)_{1/2}$.

Il se présente sous forme de cristaux blancs ou de poudre granulée blanche.
Il est très soluble dans l'eau.

4. ESSAIS

4.1 Perte à la dessiccation (Matières volatiles)

Après 4 heures de dessiccation à l'étuve à 105°C, la perte de poids ne doit pas être supérieure à 4 p. 100.

4.2 Préparation de la solution pour essais.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, placer 10 g de tartrate neutre de potassium et compléter au trait de jauge avec de l'eau.

Sur cette solution effectuer les mêmes essais que ceux figurant à la monographie de l'acide L(+) tartrique et appliquer les mêmes limites.

4.3 Sodium

Sur la solution préparée pour essais (4.2), doser le sodium par photométrie de flamme. Selon la méthode du Recueil. (Teneur en sodium inférieure à 1 p. 100).

4.4 Fer

A 10 ml de solution préparée pour essais (4.2), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 2 ml de solution de thiocyanate de potassium à 5 p. 100 (R). La coloration rouge obtenue ne devra pas être plus intense que celle d'un témoin préparé avec 1 ml d'une solution de sel de fer(III) à 0,010 g de fer par litre (R), 9 ml d'eau et les mêmes quantités des mêmes réactifs. (Teneur inférieure à 10 mg/kg).

Le Fer peut également être dosé par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode du Recueil.

4.5 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (4.2), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

4.6 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (4.2), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

4.7 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (4.2), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

4.8 Distinction d'avec le racémate de potassium

Dans un tube à essais, placer 10 ml d'eau, 1 ml de la solution préparée pour essais (4.2), 1 ml d'acide acétique cristallisable (R), et 2 ml de solution d'acétate de calcium à 25 % (R) , il ne doit pas se produire instantanément de précipité cristallin blanc.

4.9 Oxalate

Sur la solution préparée pour essais (4.2), doser l'oxalate selon la méthode décrite en annexe. (Teneur , exprimée en acide oxalique, inférieure à 100 mg/kg, après dessication).

5. CONSERVATION

Le tartrate de potassium doit être conservé dans un récipient hermétiquement clos.

MATIERES PROTEIQUES D'ORIGINE VEGETALE ISSUES DE POIS ET POMME DE TERRE

OENO 28/2004
OIV-OENO 495-2013
OIV-OENO 557-2015
OIV-OENO 575-2016
OIV-OENO 723-2024

1 OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les matières protéiques d'origine végétale décrites dans cette monographie sont extraites de pois (*Pisum sativum*) ou de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Elles sont composées principalement de protéines et peuvent contenir comme composantes minoritaires des hydrates de carbone (fibres, amidon, sucres), des matières grasses et des minéraux. Elles sont destinées à l'alimentation humaine.

Les matières protéiques végétales sont utilisées pour le collage des moûts et des vins.

Elles se présentent sous forme de poudre blanchâtre, beige ou jaunâtre, sont solubles dans l'eau en totalité ou en partie en fonction du pH. Elles peuvent aussi se présenter sous forme liquide avec une teneur supérieure ou égale à 50 g/l. Les solutions sont stabilisées avec du dioxyde de soufre.

2 Etiquetage

Les indications suivantes doivent figurer sur l'étiquette d'emballage : origine végétale de la protéine, teneur minimale en protéine, conditions de sécurité et de conservation et date limite d'utilisation.
Sans préjudice des dispositions en vigueur dans les pays où ces produits sont commercialisés en vue de leur utilisation, l'origine OGM de la matière première est indiquée sur l'étiquette de l'emballage.

3 ESSAIS

3.1 Perte à la dessiccation

Dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre avec couvercle, placer 2 g de protéine. Dessécher à l'étuve à 105 °C pendant 6 heures. Laisser refroidir en capsule ouverte et en dessiccateur. Peser.

La perte de poids ne doit pas dépasser 12 % sur la préparation en poudre.

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au poids sec

3.2 Dosage de l'azote total

Sur une prise d'essai de 0,2 g procéder comme il est indiqué en annexe au chapitre II du Codex Œnologique international.

L'azote total doit être supérieur à 10 p 100 du poids de poudre (correspondant à environ 65 % en protéine).

3.3 Cendres

Incinérer le résidu laissé dans la détermination de la perte à la dessiccation (3.1) en le chauffant progressivement à 600 °C au four à moufle jusqu'à obtention d'un résidu blanc et après l'avoir saupoudré de 0,2 à 0,3 g de paraffine sans cendres destinée à éviter le débordement de la masse.

Le taux de cendres totales doit être inférieur à 8%.

3.4 Préparation de la solution pour essais

Après la pesée, dissoudre les cendres dans 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau. Chauffer pour activer la dissolution et ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtention d'un volume égal à 25 fois le poids de protéine sèche. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0,04 g de protéine sèche.

3.5 Fer

10 ml de solution pour essais préparée selon 3.4 sont additionnés de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R), d'une goutte de permanganate de potassium à 1 p 100 (R) et de 2 ml de thiocyanate de potassium à 5 p 100 (R).

Si une coloration rouge apparaît, elle doit être inférieure à celle d'un témoin préparé avec 6 ml de solution fer (III) à 0,010 g par litre (R), 4 ml d'eau et les mêmes quantités d'acide chlorhydrique concentré (R) et de thiocyanate de potassium à 5 p 100 (R).

La teneur en fer doit être inférieure à 150 mg/kg, excepté pour les protéines de pois et de pomme de terre, dans lesquelles la teneur doit être inférieure à 300 mg/kg>.

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

3.6 Chrome

Dans une fiole conique de 50 ml, placer 10 ml de la solution préparée selon 3.4, 1 ml d'une solution de persulfate d'ammonium à 15 p 100 (R), 0,5 ml d'une solution de nitrate d'argent à 1 p 100 (R). Chauffer et ajouter goutte à goutte jusqu'à coloration rose persistante du permanganate de potassium en solution à 3 p 100 (R). Mettre quelques gouttes en excès et maintenir une douce ébullition pendant 10 minutes. Si, au cours de l'ébullition, la solution se décolore, ajouter du permanganate de potassium. Après 10 minutes, introduire goutte à goutte de l'acide chlorydrique dilué au 1/10 (R) jusqu'à complète décoloration.

Après refroidissement, transvaser dans une fiole jaugée de 20 ml et ajouter 2 ml de diphénylcarbazide en solution à 0,05 p 100 dans l'alcool (R) fraîchement préparée. Porter à 20 ml.

Si une coloration rouge violacée apparaît, elle doit être inférieure à celle obtenue en traitant 4 ml de solution de dichromate de potassium à 0,001 g de chrome par litre (R) par 2 ml d'acide sulfurique à 5 p 100 (R), 5 ml d'eau distillée, en ajoutant après mélange 2 ml de solution de diphénylcarbazide à 0,05 p 100 dans l'alcool (R) et en portant à 20 ml.

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

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

3.7 Cuivre

2,5 ml de la solution pour essais préparée selon 3.4, sont placés dans un tube à essais avec 7,5 ml d'eau, 0,5 ml d'acide citrique en solution chlorhydrique (R), 1 ml d'hydroxyde d'ammonium 5 M (R), 0,5 ml de réactif au diéthyldithiocarbamate de sodium (R). Si une coloration jaune apparaît, elle ne doit pas être plus intense que celle obtenue en ajoutant à 4,7 ml d'une solution de cuivre à 1 mg par litre (R) portés à 10 ml, les mêmes quantités des mêmes réactifs.

La teneur en cuivre doit être inférieure à 35 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

3.8 Zinc

1,25 ml de la solution pour essais préparée selon 3.4, sont additionnés de 3,75 ml d'eau distillée, 5 ml de solution tampon acétate (R), 1 ml de solution de thiosulfate de sodium à 25 p 100 (m/v) (R), 5 ml de solution de dithizone à 25 mg par litre dans le chloroforme ou le dichlorométhane (R). Agiter pendant 2 minutes. Séparer la phase organique ; sa coloration doit être inférieure à celle obtenue en traitant avec les mêmes quantités des mêmes réactifs 2 ml de solution de zinc à 1 mg par litre (R).

La teneur en zinc doit être inférieure à 50 mg/kg, excepté pour les protéines de pois, dans lesquelles la teneur doit être inférieure ou égale à 150 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du zinc par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

3.9 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (3.4), effectuer le dosage à l'aide de la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international

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

3.10 Mercure

Effectuer le dosage du mercure à l'aide de la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

3.11 Arsenic

Effectuer le dosage de l'arsenic à l'aide de la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

3.12 Cadmium

Effectuer le dosage du cadmium à l'aide de la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international.

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

4 CONTROLE MICROBIOLOGIQUE

4.1 Micro-organismes viables totaux

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

Teneur inférieure à 5.10^4 UFC/g de préparation.

4.2 *Escherichia coli*

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

Absence contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.3 Salmonelles

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

4.4 Coliformes

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

Moins de 10^2 UFC/g de préparation.

4.5 Levures

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

Moins de 10^3 UFC/g de préparation.

4.6 Moisissures

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

Moins de 10^3 UFC/g de préparation.

5 RECHERCHE DE MYCOTOXINES ET RESIDUS DE PESTICIDES

Selon des méthodes d'analyses à déterminer

5.1 Aflatoxines B_1

Procéder aux analyses selon la méthode ISO 16050

Moins de 2 µg/kg.

5.2 Aflatoxine B_1, B_2, G_1, G_2

Procéder aux analyses selon la méthode ISO 16050

Moins de 4 µg/kg au total.

5.3 Résidus de pesticides organophosphorés *

Moins de 10 mg/kg.

5.4 Résidus de pesticides organochlorés *

Moins de 0,1 mg/kg.

5.5 Ochratoxine A

A partir d'une solution aqueuse de 5 g/l de protéine végétale, effectuer le dosage à l'aide de la méthode décrite au recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts après adaptation.

Moins de 5 µg/kg.

6 RECHERCHE SPECIFIQUES POUR SOLANUM TUBEROSUM

6.1 Glycoalcaloïdes (□-solanine et □-chaconine)

Procéder à l'analyse conformément à la méthode AOAC 997.13.

Teneur maximale inférieure à 300 mg/kg de protéine de pomme de terre.

7 CONSERVATION

Les matières protéiques végétales doivent être conservées en récipient clos ou en sac imperméable à l'humidité dans des locaux tempérés.

* Méthode à décrire par la Sous-commission des méthodes d'analyse

ALCOOL RECTIFIE D'ORIGINE AGRICOLE

(Oeno 11/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Alcool rectifié ou "neutre" obtenu par distillation et rectification à partir de vin, de lie de vin ou des produits de la fermentation alcoolique de marc de raisin ou de raisins secs ou de toutes autres matières premières végétales agricoles.

L'alcool rectifié d'origine agricole entre dans la composition de certaines boissons spiritueuses et vins spéciaux.

2. COMPOSITION

A la température de 20°C, 100 volumes de cet alcool renferment au moins 96 volumes d'éthanol.

Remarque : **Les contrôles et essais décrits ci-dessous en caractères italiques ne sont pas obligatoires, ils ne sont à exécuter que sur demande.**

3. CARACTERES

Liquide incolore, limpide, complètement volatil, d'odeur pénétrante, de saveur brûlante. Il est inflammable et brûle sans fumée avec une flamme bleue.

Il doit distiller en totalité entre 78 et 79°C.

3.1 Solubilité :

L'alcool neutre est miscible à l'eau en toutes proportions avec un dégagement de chaleur sensible et une contraction de volume. Il est miscible également avec l'acétone, le chloroforme, l'éther éthylique, le glycérol et un volume égal d'huile de ricin.

3.2 Caractérisation :

- Chauffer légèrement dans un tube à essais un mélange de 1 ml d'alcool neutre, vingt gouttes d'acide sulfurique concentré (R) et 10 g d'acétate de sodium (R), il se dégage une odeur caractéristique d'acétate d'éthyle.

- Mélanger quelques gouttes d'alcool et 1 ml d'acide sulfurique concentré (R), ajouter quelques gouttes de solution de dichromate de potassium à 10 p. 100 (R), le liquide devient vert et il se dégage une odeur d'éthanal.

- Diluer 0,5 ml d'alcool avec 4,5 ml d'eau. Ajouter 1 ml de solution 1 M d'hydroxyde de sodium puis lentement 2 ml de solution d'iodure de potassium iodé (R). Il se développe une odeur d'iodoforme, suivie de la formation d'un précipité jaune.

3.3 Caractérisation de l'origine agricole :

Cette détermination s'effectuera par la mesure du rapport 14C/12C (scintillation) de l'éthanol selon la méthode décrite au Recueil des Boissons spiritueuses.

4. ESSAIS

4.1 Aspect

Prendre deux éprouvettes identiques en verre blanc d'environ 250 mm de hauteur, remplir l'une d'alcool, l'autre d'eau, cette dernière servant de témoin. Examiner les liquides suivant l'axe des cylindres, l'alcool ne devra pas présenter de coloration appréciable.

Dans une éprouvette ou dans un tube d'environ 250 mm de hauteur et 25 mm de diamètre, verser 40 ml d'alcool, les diluer avec 80 ml d'eau, le mélange ne devra présenter ni trouble, ni odeur, ni saveur étrangères.

4.2 Matières odorantes étrangères

Laisser 10 ml d'alcool s'évaporer spontanément sur une bande de papier à filtrer blanc, aucune odeur étrangère ne devra être perçue ni au cours, ni en fin d'évaporation.

4.3 Extrait sec ou résidu non volatil

Dans une capsule tarée de 25 ml, chauffée au bain d'eau à 100°C, évaporer peu à peu 100 ml d'alcool. Peser. L'extrait sec doit être inférieur à 1,5 g/hl d'éthanol à 100 % vol.

4.4 Métaux lourds

Reprendre par 10 ml d'acide chlorhydrique dilué (R) le résidu éventuel laissé par l'évaporation de 100 ml d'alcool lors de la détermination de l'extrait sec ; après chauffage de quelques minutes au bain d'eau à 100°C en vue d'activer la dissolution de ce résidu, transvaser la solution acide dans une fiole

jaugée de 25 ml, la capsule étant rincée à trois reprises avec 5 ml d'eau et le volume amené à 25 ml. Prélever 5 ml de cette solution dans un tube à essais. Ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R), 7,5 ml d'eau et 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). La solution ne devra présenter ni précipité blanc, ni précipité noir, ni coloration brune ou tout au moins celle-ci ne devra pas être plus intense que celle prévue à la méthode générale. (Teneur en métaux lourds exprimée en plomb, après concentration de l'alcool de moitié, 0,5 mg/l).

4.5 Plomb

Sur la solution obtenue au paragraphe 4.4 effectuer le dosage du plomb selon la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 0,5 mg/l).

4.6 Mercure

Sur la solution obtenue au paragraphe 4.4 effectuer le dosage du mercure selon la méthode décrite en annexe (Teneur en mercure inférieure à 0,2 mg/l).

4.7 Arsenic

Sur la solution obtenue au paragraphe 4.4 effectuer le dosage de l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 0,5 mg/l après avoir concentré l'alcool de moitié).

4.8 Cétones, propan-2-ol et 2-méthylpropan-1-ol

A 1 ml d'alcool, ajouter 3 ml d'eau et 10 ml de solution de sulfate de mercure (II) (R), chauffer au bain d'eau à 100°C. Il ne devra pas se former de précipité dans les 3 mn qui suivent.

4.9 Temps de décoloration du permanganate (Essai Barbet)

Dans une fiole, introduire 50 ml de l'échantillon d'alcool, ajouter 2 ml de la solution fraîchement préparée de permanganate de potassium à 0,20 g/l (R), placer le récipient dans un bain d'eau à 15°C et déclencher aussitôt un chronomètre. Eviter pendant la durée de l'essai l'exposition directe de l'échantillon à la lumière naturelle ou artificielle.

Placer simultanément dans le bain d'eau à 15°C, 50 ml de la solution de comparaison obtenue en mélangeant 3 ml de la solution de chlorure de cobalt à 5 p. 100 (R), 4,2 ml de la solution de nitrate d'uranyle à 4 p. 100 (R) et en complétant à 50 ml avec de l'eau distillée, et comparer la couleur de l'essai à celle de la solution étalon. Arrêter le chronomètre lorsqu'elles sont identiques. Noter le temps écoulé. Le temps de décoloration du permanganate devra être supérieur ou égal à 20 minutes.

4.10 Dérivés sulfurés

Introduire dans un tube à essai 1 ml environ de mercure puis 20 ml d'alcool. Agiter pendant 1 à 2 minutes. La surface du mercure doit demeurer brillante sans apparition d'un voile noirâtre.

4.11 Méthanol

4.11.1 Dosage colorimétrique :

Solution étalon : dans une fiole jaugée de 50 ml, peser 5 g de méthanol et compléter au trait avec de l'éthanol (exempt de méthanol).

Dans une fiole jaugée de 1 litre, placer 1 g de la solution précédente (soit 1,25 ml) contenant 125 mg de méthanol, 250 ml d'alcool absolu (exempt de méthanol) ; compléter à 1000 ml avec de l'eau.

Technique de l'essai : dans une fiole jaugée de 50 ml, placer $\frac{1250}{A}$ ml d'alcool (A étant le titre alcoométrique de l'alcool à essayer), porter au trait de jauge avec de l'eau. Dans un tube à essais, placer 1 ml de cet alcool dilué à 25 p. 100 vol., ajouter quatre gouttes d'acide phosphorique à 50 p. 100 *(m/m)* (R), quatre gouttes de solution de permanganate de potassium (R) à 5 p. 100 *(m/m)*, agiter et laisser au repos 10 mn. Décolorer le permanganate par quelques gouttes (huit en général) de solution à 2 p. 100 *(m/v)* d'anhydrosulfite (métabisulfite) de potassium (R) éviter tout excès. Ajouter 5 ml de solution sulfurique d'acide chromotropique (R). Porter sur bain d'eau à 70°C pendant 20 mn. Il ne devra pas apparaître de coloration violette, ou cette coloration ne devra pas être plus intense que celle d'un témoin préparé selon la même technique et avec les mêmes réactifs, avec 1 ml de la solution étalon ci-dessus (teneur maximale en méthanol 50 g/hl d'éthanol à 100 % vol.).

4.11.2 Dosage par chromatographie en phase gazeuse :

Appareillage : (à titre d'exemple)

- Chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme ;
- Colonnes capillaires de type semi polaire par ex. Carbowax 20 M ®.

Technique de l'essai : (ces informations sont données à titre d'exemple) :

- Préparer une solution hydro-alcoolique à 1 g par litre de l'étalon interne (4-méthylpentan-2-ol) dans l'alcool à 50 p. 100 vol.
- Préparer la solution à doser en ajoutant 5 ml de cette solution à 50 ml de l'alcool réduit à 50 p. 100 vol.

- Préparer une solution de référence de méthanol à 100 mg par litre d'alcool à 50 p. 100 vol. Ajouter 5 ml de solution d'étalon interne à 50 ml de cette solution.

- Injecter dans le chromatographe, 2 microlitres de la solution à doser et de la solution de référence, additionnées de l'étalon interne.

- La température du four est de 90°C et le débit du gaz vecteur de 25 ml par minute ;.

- Soit

S : la surface du pic du méthanol de la solution de référence,

S_X : la surface du pic du méthanol de la solution à doser,

i : la surface du pic de l'étalon interne des la solution à doser,

I : la surface du pic de l'étalon interne de la solution de référence,

- La teneur en méthanol, exprimée en milligrammes par litre d'alcool à 50 p. 100 vol., est donnée par la relation :

$$C = 100. \frac{I}{i} . \frac{Sx}{S}$$

- Teneur en grammes par hectolitre d'alcool pur : 0,20 C. (Teneur maximale en méthanol 50 g/hl d'éthanol à 100 % vol.).

4.12 Hydroxyde d'ammonium et bases azotées

Dans un ballon de 200 ml, introduire 50 ml de l'alcool à examiner, ajouter 40 ml d'eau et deux gouttes d'acide phosphorique (ρ *20= 1,58*) ; distiller et Recueillir 80 ml, qui sont rejetés. Au résidu refroidi, ajouter 2 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 10 p. 100 (R). Distiller à nouveau en Recueillant 7 ml environ du distillat dans un tube à essais, dans lequel ont été préalablement introduits 2 ml d'eau et une goutte de solution de rouge de méthyle (R), le distillat étant amené au fond du tube à l'aide d'un tube effilé. Titrer à l'aide d'une solution 0,01 M d'acide chlorhydrique jusqu'à virage au rouge de l'indicateur : soit n le nombre de millilitres de solution 0,01 M d'acide chlorhydrique employés.

1 ml de solution 0,01 M d'acide chlorhydrique correspond à 0,00014 g d'azote (ammoniacal ou de bases azotées volatiles).

La quantité d'azote ammoniacal ou de bases azotées exprimée en milligrammes d'azote par litre d'éthanol est de

$$\frac{280 \cdot n}{A}$$

A étant le titre alcoométrique de l'alcool examiné.

L'alcool neutre ne devra pas contenir plus de 1 mg d'azote (ammoniacal ou de bases azotées volatiles) pour 1 l d'éthanol.
(Teneur maximale en hydroxyde d'ammonium et bases azotées exprimées en azote 0,1 g/hl d'éthanol à 100 % vol.).

4.13 Acidité

Dans une fiole conique de 250 ml, placer 100 ml d'alcool ramené à 50 p. 100 vol. ; ajouter une goutte de solution de rouge de phénol (R) et, goutte à goutte, de la solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium jusqu'à virage au rouge, soit *n* le nombre de millilitres employés.

1 ml de solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium correspond à 0,0006 g d'acide acétique.

L'acidité exprimée en milligrammes d'acide acétique par litre d'éthanol est égale à 12 *n*.

Cette acidité devra être inférieure à 15 mg/l d'éthanol (soit 1,5 g/hl) au moment de la livraison de l'alcool.

(Teneur maximale en acidité exprimée en acide acétique, 1,5 g/hl d'éthanol à 100 % vol.).

Remarque : Le virage de l'indicateur lors du dosage de l'acidité devra être net et stable. Dans le cas contraire et surtout si l'acidité excède 15 mg/l, une nouvelle épreuve devra être effectuée après dégazage de l'échantillon, suivant la technique ci-dessous

100 ml d'alcool ramené à 50 p. 100 vol. sont introduits dans un ballon de 250 ml dont le bouchon est traversé par deux tubulures.

L'une permet de maintenir le ballon sous le vide d'une trompe à eau ; la dépression est réglée entre 55 et 65 cm de mercure ;

L'autre permet de réaliser, au cours de l'opération, un barbotage d'air débarrassé de gaz carbonique par un flacon laveur à soude ; pour cela, la tubulure se termine par une partie capillaire plongeant dans l'alcool. Le débit d'air traversant le flacon laveur est de 1 ml par seconde environ.

La durée de l'opération doit être comprise entre 3 et 5 minutes. Le titrage est effectué dans le même ballon.

4.14 Esters

A la solution préparée pour la détermination de l'acidité en 4.13 (soit 100 ml d'alcool à 50 % vol.), ajouter 10 ml exactement mesurés de solution

0,1 M d'hydroxyde de sodium ; boucher, agiter et maintenir à une température égale ou légèrement supérieure à 20°C. Après 24 heures de contact, titrer l'excès d'hydroxyde de sodium par une solution 0,1 M d'acide chlorhydrique ; soit *n'* le nombre de millilitres utilisés.

Pour mesurer le volume de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique qui neutralise les 10 ml de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium en présence de la même quantité d'alcool et du même indicateur dont le virage est obtenu par pH décroissants, faire l'essai suivant : placer 100 ml d'alcool ramené à 50 p. 100 dégazé dans une fiole conique de 250 ml, ajouter une goutte de solution de rouge de phénol (R) et les *n* millilitres de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium qui produisent le virage au rouge de l'indicateur. Ajouter 10 ml de la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium et, immédiatement après, la solution 0,1 M d'acide chlorhydrique pour obtenir le même virage de l'indicateur, soit *n"* le volume employé.

1 ml de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium correspond à 0,0088 g d'acétate d'éthyle. La concentration d'esters, exprimée en milligrammes d'acétate d'éthyle, contenue dans 1 l d'éthanol est donnée par la relation :

$$176\ (n'' - n')$$

Cette teneur ne devra pas être supérieure à 13 mg pour 1 l d'éthanol (soit 1,3 g/hl) au moment de la livraison de l'alcool.
(Teneur maximale en esters exprimée en acétate d'éthyle 1,3 g/hl d'éthanol à 100 % vol.).

4.15 Aldéhydes

Solution étalon : dans une fiole jaugée de 100 ml, placer 268,3 mg d'acétal pur (Eb. : 102°C) et compléter au trait avec de l'alcool à 50 p. 100 vol. exempt d'aldéhydes.

Diluer cette solution au 1/10 dans l'alcool à 50 p. 100 vol. exempt d'aldéhyde. La solution obtenue contient 100 mg d'éthanal par litre d'alcool à 50 p. 100 vol. soit 20 g dans 100 litres d'éthanol.

Technique de l'essai : dans un tube à essais, introduire 10 ml de l'alcool réduit à 50 p. 100 vol. Dans un second tube, placer 5 ml de la solution à 100 mg d'éthanal par litre d'alcool à 50 p. 100 vol. et 5 ml d'alcool à 50 p. 100 vol. sans aldéhydes. Ajouter aux deux tubes 4 ml de solution de chlorhydrate de rosaniline décolorée par l'acide sulfureux (R) , agiter et comparer les colorations obtenues après 20 minutes.

L'alcool à essayer doit donner une coloration au plus égale à celle de la solution étalon.

(Teneur maximale en aldéhydes exprimée en éthanal 0,5 g/hl d'éthanol à 100 % vol.).

Remarque, Alcool à 50 p. 100 vol. sans aldéhydes : introduire 100 ml de dilution d'alcool à 50 p. 100 vol. dans un ballon de 250 ml avec 2 g de chlorhydrate de métaphenylènediamine (R) et deux grains de pierre ponce. Relier le ballon à un réfrigérant à reflux et maintenir une douce ébullition durant une heure. Après refroidissement, relier le ballon à l'appareillage de distillation et distiller lentement sans surchauffer les parois. Recueillir 75 ml de distillat dans une fiole jaugée de 100 ml. Porter au trait avec de l'eau distillée.

4.16. Alcools supérieurs

Il s'agit du propan-1-ol, du 2-méthylpropan-1-ol, du 2- et 3-méthylbutan-1-ol.

Dosage par chromatographie en phase gazeuse (voir méthanol).

Teneur maximale en ce qui concerne la somme de chacun des alcools : 0,5 g/hl d'éthanol à 100 % vol.

4.17 Furfural

10 ml d'alcool ramené à 50 % vol. sont introduits dans un tube bouchant à l'émeri. Ajouter 0,5 ml d'aniline (R) et 2 ml d'acide acétique cristallisable (R). Agiter. Aucune coloration rose saumon ne devra être perceptible avant 20 minutes.

5. CONSERVATION

L'alcool doit être conservé dans des récipients inertes non susceptibles de céder des métaux, ions ou éléments constitutifs des matières plastiques.

Les récipients doivent être conformes aux normes de sécurité et les conditions de stockage doivent aussi respecter les normes de sécurité.

ALCOOL RECTIFIE D'ORIGINE VITIVINICOLE

(Oeno 12/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Alcool obtenu par distillation et rectification exclusivement à partir du vin, de marc de raisin, de lie de vin ou de raisins secs fermentés.

L'alcool rectifié d'origine vitivinicole entre dans la composition de certaines boissons spiritueuses et vins spéciaux.

2. COMPOSITION

A la température de 20°C, 100 volumes de cet alcool renferment au moins 96 volumes d'éthanol.

Remarque : **Les contrôles et essais décrits ci-dessous en caractères italiques ne sont pas obligatoires, ils ne sont à exécuter que sur demande.**

3. CARACTERES

Liquide incolore, limpide, complètement volatil, d'odeur pénétrante, de saveur brûlante. Il est inflammable et brûle sans fumée avec une flamme bleue.

Il doit distiller en totalité entre 78 et 79°C.

3.1 Solubilité :

L'alcool neutre est miscible à l'eau en toutes proportions avec un dégagement de chaleur sensible et une contraction de volume. Il est miscible également avec l'acétone, le chloroforme, l'éther éthylique, le glycérol et un volume égal d'huile de ricin.

3.2 Caractérisation :

- Chauffer légèrement dans un tube à essais un mélange de 1 ml d'alcool neutre, vingt gouttes d'acide sulfurique concentré (R) et 10 g d'acétate de sodium (R), il se dégage une odeur caractéristique d'acétate d'éthyle.

- Mélanger quelques gouttes d'alcool et 1 ml d'acide sulfurique concentré (R), ajouter quelques gouttes de solution de dichromate de

potassium à 10 p. 100 (R), le liquide devient vert et il se dégage une odeur d'éthanal.

- Diluer 0,5 ml d'alcool avec 4,5 ml d'eau. Ajouter 1 ml de solution 1 M d'hydroxyde de sodium puis lentement 2 ml de solution d'iodure de potassium iodé (R). Il se développe une odeur d'iodoforme, suivie de la formation d'un précipité jaune.

3.3 Caractérisation de l'origine vitivinicole :

Cette détermination s'effectuera par la mesure du rapport 14C/12C (scintillation) de l'éthanol selon la méthode décrite au Recueil des Boissons spiritueuses.

3.4 Si nécessaire, l'origine vitivinicole de l'alcool peut être déterminée par les méthodes isotopiques du Recueil des Méthodes d'Analyse des Vins et des Moûts.

4. ESSAIS

Les essais sont identiques à ceux de l'alcool d'origine agricole rectifié avec les teneurs limites suivantes

4.1 Méthanol

Teneur maximale 50 g/hl d'éthanol à 100 % vol.

4.2 Acidité

Teneur maximale en acide acétique 1,5 g/hl d'éthanol à 100 % vol.

4.3 Esters

Teneur maximale en acétate d'éthyle 1,3 g/hl d'éthanol à 100 % vol. (ou 5 g/hl)

4.4 Aldéhydes

Teneur maximale en éthanal 0,5 g/hl d'éthanol à 100 % vol.

4.5 Alcools supérieurs

Teneur maximale 0,5 g/hl d'éthanol à 100 % vol.

4.6 Préparation de la solution pour essais

Reprendre par 10 ml d'acide chlorhydrique dilué (R) le résidu éventuel, laissé par l'évaporation de 100 ml d'alcool lors de la détermination de l'extrait sec ; après chauffage de quelques minutes sur bain d'eau à 100°C en vue d'activer la dissolution de ce résidu, transvaser la solution acide dans

une fiole jaugée de 25 ml, la capsule étant rincée à trois reprises avec 5 ml d'eau et le volume amené à 25 ml.

4.7 Métaux lourds

Prélever 5 ml de la solution préparée selon l'alinéa 4.6 dans un tube à essais. Ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R), 7,5 ml d'eau et 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). La solution ne devra présenter ni précipité blanc, ni précipité noir, ni coloration brune ou tout au moins celle-ci ne devra pas être plus intense que celle prévue à la méthode générale (Teneur en métaux lourds exprimée en plomb, après concentration de l'alcool de moitié, 0,5 mg/l).

4.8 Plomb

Effectuer le dosage du plomb sur la solution préparée pour essais (4.6), selon la méthode du Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 0,5 mg/l.)

4.9 Mercure

Effectuer le dosage du mercure sur la solution préparée pour essais (4.6), selon la méthode décrite en annexe. (Teneur en mercure inférieure à 0,2 mg/l).

4.10 Arsenic

Effectuer le dosage de l'arsenic sur la solution préparée pour essais (4.6), selon la méthode décrite en annexe. (Teneur en arsenic inférieure à 0,5 mg/l).

5. CONSERVATION

L'alcool doit être conservé dans des récipients inertes non susceptibles de céder des métaux, ions ou éléments constitutifs des matières plastiques.

Les récipients doivent être conformes aux normes de sécurité et les conditions de stockage doivent aussi respecter les normes de sécurité.

MEMBRANES D'OSMOSE INVERSE
(Oeno 30/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Membrane appartenant à la famille des membranes semi-perméables composites à couche mince (dites TFC, Thin Film Composite).

L'osmose inverse est un traitement d'enrichissement des moûts, au moyen d'un procédé membranaire, pour éliminer l'eau pure et, de ce fait, augmenter le taux de sucres et autres constituants en solution des moûts de raisin.

2. PRINCIPE DU PROCEDE

C'est une méthode physique d'élimination d'une partie de l'eau d'un moût à l'aide d'une membrane semi-perméable sous l'action d'un gradient de pression, à température ambiante et sans changement ni altération de son état.

L'appareillage est constitué essentiellement d'une pompe dite « de gavage » alimentant une pompe haute pression (par exemple 100 bars) permettant de vaincre la pression osmotique, d'un bloc membrane et des appareils de contrôle, débitmètre, indicateur et régulateur de pression, etc..

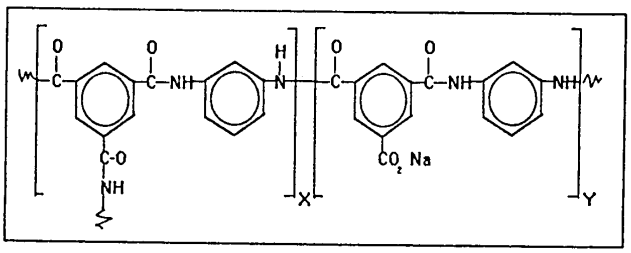
3. COMPOSITION

Tous les matériaux mis en œuvre dans la procédure sont en conformité avec la réglementation relative aux matériaux au contact des aliments (tuyaux, pompes, matériel de contrôle, joints, etc..), et en particulier la membrane d'osmose inverse.

Les substances participant à la composition de la membrane respectent les réglementations en vigueur.

Ces membranes sont préparées par polymérisation *in situ* d'un polymère sur la surface d'un substrat poreux. Le substrat est usuellement un ultrafiltre de type polysulfone. La couche mince sert de membrane discriminante, tandis que le substrat poreux sert de support physique.

A titre d'exemple, la formule structurale de base du polyamide est la suivante :



4. MISE EN ŒUVRE

Lors de la fabrication, la membrane traverse de nombreux bains d'extraction contenant de l'eau à haute température pour éliminer toute trace de solvant et de monomères résiduels.

En particulier, elle ne peut céder dans des conditions normales ou imprévisibles des constituants susceptibles de présenter un danger pour la santé humaine, (notamment en ce qui concerne le composant le plus facilement mesurable, le chlorure de sodium, elle doit assurer un taux de rétention supérieur à 99 %). Elle ne doit pas entraîner une modification inacceptable de la composition du moût de raisin (ou d'une solution contenant 170 g/l de sucre, 5 g/l d'acide tartrique neutralisé à pH 3,5 par de l'hydroxyde de potassium), ni entraîner une altération des caractères organoleptiques

5. REGENERATION DES MEMBRANES

L'utilisateur peut employer comme agent régénérant, des produits inorganiques autorisés par la réglementation, à condition de terminer l'opération par un rinçage à l'eau permettant une élimination complète de ce régénérant avant l'introduction du moût.

6. LIMITES

- Tous les matériaux au contact doivent respecter les normes en vigueur.
- Aucune altération des caractères organoleptiques du moût traité ne doit être perceptible.

Tout relargage éventuel de produit ou dérivé constituant la membrane doit rester inférieur à 50 µg/l au total, valeur recommandée, et respecter les limites réglementaires de migration spécifique des différents constituants des matériaux.

7. CONTRAINTES PARTICULIERES

La membrane doit être fournie exclusivement par fournisseur ou distributeur agréés.

- Il doit être mis en œuvre un contrôle et une délimitation de l'utilisation de la membrane par:
  - présence d'un compteur horaire et d'un compteur volumétrique plombés au niveau de la sortie du perméat,
  - impossibilité physique inhérente au process d'augmenter la concentration du moût au-delà du seuil fixé.

Fibres vegetales selectives

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les fibres végétales sélectives proviennent des parties comestibles de certains végétaux, généralement d'origine céréalière. Les fibres végétales subissent une succession de traitements mécaniques et d'extractions permettant de concentrer le complexe actif sans détériorer la structure de la fibre végétale. L'objectif est d'augmenter la capacité d'adsorption.
Les fibres végétales activées fixent certains résidus de pesticides potentiellement présents dans le vin et l'ochratoxine A. Elles sont utilisées au cours d'une filtration des vins.

2. ÉTIQUETAGE

L'étiquetage indiquera les mentions suivantes :
- le nom ou dénomination de vente
- la mention « produit destiné à un usage œnologique »
- le numéro de lot et la date d'expiration
- les conditions de conservation
- l'origine et la composition des fibres
- le nom ou la raison sociale du fabricant
- l'adresse du fabricant
- la quantité nette

3. CARACTÈRES

Le produit est insoluble et se présente sous forme d'une poudre très fine.

4. CARACTÈRES D'IDENTITÉ

Les fibres végétales sélectives ont une teneur totale en composés pariétaux insolubles (fraction NDF) de minimum 90% (m/m), déterminée par la méthode Van Soest en annexe 1.

5. ESSAIS

5.1 Perte à la dessiccation

Placer 5 g de produit dans un dessiccateur à 90°C pendant 15 minutes. La perte de poids ne doit pas dépasser 8 % du poids initial.

Toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

5.2 Cendres

Incinérer progressivement, sans dépasser 550 °C, le résidu laissé dans la détermination de la perte à la dessiccation.

Le poids de cendres doit être inférieur à 1 %.

5.3 Produits solubles en solution aqueuse
Dans un récipient de 250 mL placer 10 g de fibres végétales sélectives puis verser lentement en agitant manuellement 100 mL d'eau pour obtenir une suspension homogène. Recueillir les fibres végétales sélectives sur un filtre, rincer le récipient avec de l'eau distillée de façon à récupérer les résidus de fibres végétales sélectives. Après 48 h à une température de 45°C la perte en produits solubles ne doit pas dépasser 3 % du poids initial en matière sèche.

5.4 Essais d'adsorption de contaminants
5.4.1 Pesticides
La capacité d'adsorption (KF) en 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide (Boscalid) d'une fibre végétale sélective, déterminée selon la méthode décrite en annexe 2, doit être supérieure ou égale à 1 000 mg/kg à une dose de 2 g/L de fibres végétales sélectives.

5.4.2 Ochratoxine A
La capacité d'adsorption (KF) en Ochratoxine A (OTA) d'une fibre végétale sélective, déterminée selon la méthode décrite en annexe 3, doit être supérieure ou égale à 1 200 mg/kg à une dose de 2 g/L de fibres végétales sélectives.

5.5 Fer
Quantification par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international
La teneur en fer doit être inférieure à 100 mg/kg.

5.6 Cuivre
Quantification par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international
La teneur en cuivre doit être inférieure à 25 mg/kg.

5.7 Plomb
Quantification par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international
La teneur en plomb doit être inférieure à 5 mg/kg.

5.8 Mercure
Quantification par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

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

5.9 Arsenic
Quantification par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international
La teneur en arsenic doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.10 Cadmium
Quantification par spectrométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.11 Salmonelles
Les fibres végétales sélectives ne doivent pas contenir de salmonelles dans 25 g.
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique international.

5.12 Contrôle bactériologique
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique international.
La teneur en micro-organismes viables totaux doit être inférieure à $3x10^4$ UFC/g.

5.13 *Escherichia coli*
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique international.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

5.14 Levures
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique international.
Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation

5.15 Moisissures
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique international.
Teneur limite : 10^3 UFC/g de préparation.

ANNEXE 1

1. Méthode d'analyse des composés pariétaux insolubles, fraction NDF, selon la méthode dite du creuset (Van Soest)

1.1 Principe

Analyse des constituants des parois des végétaux (hemicellulose, cellulose et lignine) après solubilisation des protéines, amidons par traitement au détergent neutre (ND).

1.2 Matériel

1.2.1 Balance de présicion de 0,001 g
1.2.2 Etuve
1.2.3 Four
1.2.4 Dessicateur
1.2.5 Creusets filtrants (porosité 40- 100 µm)
1.2.6 Appareil de type Fibertec (ou équivalent), qui est un appareil (semi automatique / automatique) fermé permettant de traiter jusqu'à 6 creusets en même temps incluant les réactifs, et les étapes d'extractions, la portée à ébullition, le rinçage et la filtration.

1.3 Réactifs

1.3.1 α-amylase stable à la chaleur, par exemple (Ref: A3306), Sigma Chemical Co.
1.3.2 Solution de détergent neutre (NDS): pour 5L de solution:

- Laurylsulfate de sodium ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, p. m. : 288,4) – 150 g
- EDTA – di-sodium éthylènediamine tétracétate ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, p. m. : 372,23) – 93,05 g
- Di-sodium tétraborate decahydrate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, p. m. : 381,37) – 34,05 g
- Di-sodium hydrogén ophosphate dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, p.m. : 177,99) – 22,8 g
- Triethylène glycol ($C_6H_{14}O_4$, p.m. : 150,17) – 50 mL

1.4 Mode opératoire

1.4.1 Fibres insolubles dans le détergent neutre

- Préparer les creusets

Pour chaque échantillon de fibres végétales préparer 2 creusets :

(A) Creuset pour isoler les constituants insolubles (NDF)
Peser 2 g de fibres végétales dans un creuset sec et propre
Noter le poids avec une précision de 0,001g (P = poids de l'échantillon)

(B) Creuset pour mesurer la teneur en cendres de l'échantillon
Peser 1 g de fibres, végétales dans un creuset sec et propre
Noter le poids avec une précision de 0,001g (P = poids de l'échantillon)

- Insérer les creusets (dans le système de type Fibertec)

Ajouter 100 mL de la solution NDS (1.3.2) à chaque échantillon à température ambiante
Ajouter 50 µl de α-amylase (1.3.1)
Porter et maintenir à ébullition de la façon suivante :
Chauffer pendant 5-10 minutes, jusqu'à ébullition. Réduire la température et ajouter de l'antimousse (à titre d'exemple acide octanoïque) dès le début de l'ébullition. Régler la température pour maintenir l'ébullition et continuer à chauffer pendant 60 minutes.
Après 1 heure d'extraction, arrêter le chauffage, retirer la solution NDS par un système d'aspiration.

- Rincer et filtrer

Ajouter 40 mL d'eau chaude (90-100°C) dans chaque creuset, agiter/mélanger les échantillons et laisser infuser 2 minutes.
Filtrer sous vide
Répéter l'opération 4 fois.
Ajouter de l'acétone dans chaque creuset, laisser infuser pendant 2 minutes. Filtrer sous vide.
Répéter l'opération 2 fois.

- Retirer les creusets

Le creuset (A) est rincé deux fois avec de l'eau chaude (90-100 °C) et placé 12 heures à 105°C
Le creuset (B) est placé 12 heures à 105 °C, refroidi au dessicateur et pesé soit W1
(P1= *creuset + NDF fraction+ cendres totales (TA))*.
Il est ensuite placé pendant 3 heures à 500 °C, refroidi au dessicateur et pesé soit P4
(P4 = creuset+ cendres totales (TA))

1.4.2 Déterminer la teneur en matière sèche (MS)

Peser une coupelle avec une précision de 0,001 g (*P_{MS})*
Peser avec une précision de 0,001 g, 2 g de fibres végétales dans une coupelle propre et sèche soit P2
(P2 = poids avant séchage)
Placer la coupelle à 105°C pendant 16 heures, laisser refroidir au dessicateur et peser soit P3
(P3= poids après séchage)

1.5 Calculs

1.5.1 Déterminer la matière sèche

$$\textbf{MS (\%)} = \frac{\textbf{P3- } W_{MS}}{\textbf{P2}} \textbf{ x 100}$$

1.5.2 Déterminer la fraction insoluble des fibres dans le détergent neutre « neutral detergent fiber » (NDF)

$$\text{NDF (\%)} = \frac{(P1 - P4)}{P \times \frac{\% \text{ MS}}{100}} \times 100$$

ANNEXE 2

2. Mesure de la capacité d'adsorption des pesticides par les fibres végétales sélectives

2.1 Principe

Il s'agit de déterminer la capacité d'adsorption par les fibres végétales sélectives d'un fongicide utilisé pour le traitement de la vigne dont le nom commercial est : BOSCALID
Nom chimique IUPAC : 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide
Formule chimique : $C_{18}H_{12}CL_2N_2O$
N° CAS : 188425-85-6

La méthode proposée se réfère à la détermination de l'isotherme de Freundlich.

2.2 Précautions de sécurité

Les pesticides sont potentiellement toxiques et doivent donc être manipulés dans des conditions de sécurité protégeant les analystes notamment lors de la préparation des solutions mères à partir des standards analytiques purs. Les opérateurs doivent protéger leurs mains et leurs yeux et doivent manipuler sous une hotte aspirante.

2.3 Matériels

2.3.1 Verrerie courante de laboratoire : fioles jaugées, pipettes, flacons
2.3.2 Balance de précision de 0,001 g
2.3.3 Agitateur magnétique
2.3.4 Centrifugeuse

2.4 Réactifs

2.4.1 Standard analytique de 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide : sous forme poudre de pureté >99%
2.4.2 Acétone de qualité pour analyses de résidus
2.4.3 Préparation des solutions étalons de 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide :

2.4.3.1 - solution mère à 1000 mg/L de 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide dans l'acétone : dissoudre précisément 50 mg de poudre pure de standard analytique dans 50 ml d'acétone. La solution mère peut être conservée à -20 °C pendant un an au maximum.

2.4.3.2 - solutions filles à 100, 10 et 1 mg/L de 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide dans l'acétone : par dilutions successives de la solution mère dans l'acétone. Les solutions filles peuvent être conservées à -20°C durant 6 mois au maximum.

2.5 Mode opératoire

Un résumé des conditions utilisées pour la préparation des vins témoin et des vins pour essais, est présenté dans le Tableau 1 ci-dessous.

2.5.1 Préparation des vins témoins

Les vins témoins sont préparés à partir d'un vin exempt de pesticide, dans lequel sont ajoutées neuf concentrations croissantes de 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide afin d'obtenir par exemple 500 mL de chaque vin supplémenté (cf. Tableau 1). Les additions sont réalisées avec des solutions étalons filles (2.4.3.2). Deux répétitions sont réalisées par concentration. Le 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide est ensuite analysé dans les neuf vins témoins, afin d'obtenir les concentrations initiales mesurées.

2.5.2 Préparation des vins pour essais

Les 9 vins enrichis en pesticide (2.5.1) sont mis en contact avec la fibre végétale sélective.
Mode opératoire :
Ajouter 0,4 g de fibres végétales sélectives dans un petit volume de vin témoin supplémenté avec 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide puis verser le mélange dans une fiole jaugée de 200 ml et compléter à 200 mL avec ce même vin (la dose de fibre végétale est de 2 g/L).
Laisser ce vin en contact avec les fibres végétales dans un flacon bouché pendant 45 minutes sous agitation magnétique. Centrifuger pendant 5 minutes à 4500 tours/minute (3600 g). Séparer le surnageant du culot et procéder au dosage des résidus de 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide afin d'obtenir les concentrations résiduelles mesurées dans le surnageant. Cette opération est répétée pour les 9 vins témoins supplémentés en 2-chloro-N-(4'chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide (2.5.1). Deux répétitions sont réalisées par concentration.

Tableau 1 : résumé des conditions pour la détermination de la capacité d'adsorption en 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide

Temps de contact	45 minutes
Vin utilisé pour les essais	Vin exempt de pesticides (analyse préalable)
Fibres végétales sélectives	Dose 2g/L vins pour essais) Absence (vins témoins)
Molécule pesticide testée	2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide (nom commun : boscalid)
Concentrations rajoutées en 2-chloro-N-(4'chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide	5 µg/L 15 µg/L 30 µg/L 60 µg/L 120 µg/L 240 µg/L 480 µg/L 960 µg/L 1500 µg/L
Nombre de répétitions	2
Centrifugation - paramètres	Température ambiante 4500 tours /minute (environ 3600 g) pendant 5 minutes
Méthode d'analyse de résidu de 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide	Dosage de résidus de pesticides dans le vin après extraction par la méthode QuEChERS (OIV-MA-AS323-08-type II), puis analyse des extraits par UPLC/MS/MS.

2.6 Calculs

La détermination de la capacité d'adsorption en 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide est calculée d'après l'équation de Freundlich suivante :

$$CAds = KF * CRes^{1/n}$$

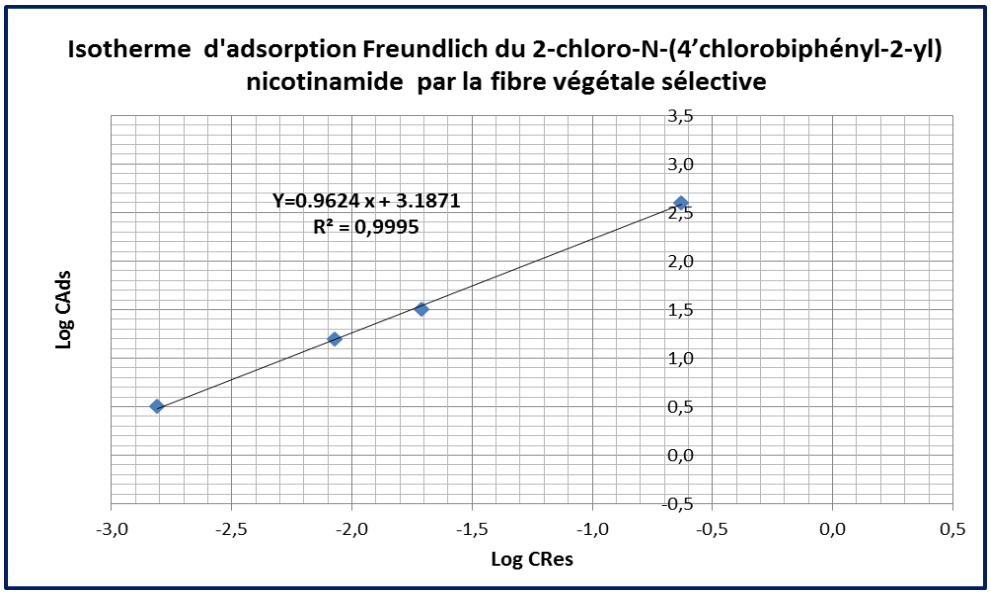
Ou sa forme linéaire : Log CAds = 1/n Log CRes + Log KF

avec KF = capacité d'adsorption de la molécule par la fibre végétale sélective en µg/g de fibre
et n = affinité de la fibre végétale sélective pour la molécule
et où :

- **CRes = concentration résiduelle en µg/mL** de 2-chloro-N-(4'chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide, mesurée dans le vin après mise en contact avec les fibres végétales sélectives
- **CAds = concentration adsorbée en µg/g** de fibre végétale sélective
    - CAds en µg/g = CAds en µg /L / 2 (car dose adsorbant = 2 g de fibre/L de vin)
    - **CAds en µg/L= concentration initiale en µg/L** mesurée dans vin témoin supplémenté avant mise en contact avec les fibres végétales sélectives) **– CRes en µg/L**

A partir des concentrations résiduelles (µg/L) mesurées, les concentrations adsorbées (µg/L) en 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide sont ainsi calculées pour chaque concentration initiale
la droite de régression **Log CAds = 1/n Log CRes + Log KF** est tracée.
La régression d'adsorption Freundlich du pesticide par la fibre végétale sélective, permet ainsi de calculer les deux constantes de Freundlich : la capacité d'adsorption en µg/g (KF) et l'affinité de la fibre pour le pesticide (n). L'équation de la droite, y = ax + b nous donne la pente a =1/n et b = Log KF.

Exemple: isotherme de Freundlich pour 2-chloro-N-(4'chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide



Ainsi, dans l'exemple ci-dessus, on peut calculer :
b = Log KF = 3,1871 soit KF =10^b = 1538,54
Et a = 1/n= 0,9624 soit n =1 /a = 1,04
L'affinité (n) de la fibre végétale sélective pour le 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide est de 1,04 et la capacité d'adsorption (KF) du 2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl) nicotinamide par la fibre végétale sélective est de 1538,54 µg /g ou mg/kg de fibre.

ANNEXE 3

3. Mesure de la capacité d'adsorption de l'Ochratoxine A par les fibres végétales sélectives

3.1 Principe

Il s'agit de déterminer la capacité d'adsorption par les fibres végétales sélectives, d'une mycotoxine:
Nom commercial : Ochratoxine A (OTA)
Nom chimique IUPAC: N-{[(3*R*)-5-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromén-7-yl] carbonyl}-L-phenylalanine
Formule chimique : $C_{20}H_{18}ClNO_6$
N° CAS : 303-47-9

La méthode proposée se réfère à la détermination de l'isotherme de Freundlich.

3.2 Précautions de sécurité

L'Ochratoxine A est une toxine classée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC), en catégorie 2B comme cancérigène possible chez l'Homme. Elle doit donc être manipulée dans des conditions de sécurité protégeant les analystes notamment lors de la préparation des solutions mères à partir des standards analytiques purs. Les opérateurs doivent protéger leurs mains et leurs yeux et doivent réaliser les manipulations sous hotte ventilée.

3.3 Matériels

3.3.1 Verrerie courante de laboratoire : fioles jaugées, pipettes, flacons
3.3.2 Balance de précision de 0,001 g
3.3.3 Agitateur magnétique
3.3.4 Centrifugeuse

3.4 Réactifs

3.4.1 Standard analytique d'Ochratoxine A (OTA) : sous forme de poudre de pureté >99%
3.4.2 Toluène, méthanol et éthanol pur (de qualité HPLC)
3.4.3 Tampon acétate de sodium pH 5,2, 0,1 mol/L : dissoudre 13,061 g d'acétate de sodium trihydraté avec 900 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique puis compléter à 1 000 mL avec de l'eau distillée.
3.4.4 Préparation des solutions étalons d'Ochratoxine A :
3.4.4.1- solution mère à 50 mg/L dans le mélange toluène-acide acétique : dissoudre précisément 5 mg d'ochratoxine pure (3.4.1) dans 100 mL du mélange toluène-acide acétique (99 :1 , v/v). La solution mère peut être conservée à -20 °C pendant un an au maximum.

3.4.4.2 - solution de travail à 20 mg/L dans le méthanol : évaporer, en utilisant un flux d'azote, une portion aliquote (20 ml) de solution mère, puis re-dissoudre dans 50 ml de méthanol pur. La solution de travail peut être conservée à -20 °C pendant six mois au maximum.

3.4.4.3 - solutions de rajout à 10, 5 et 2 mg/L dans l'éthanol : effectuer des dilutions successives de la solution de travail dans l'éthanol absolu. Les solutions de rajout peuvent être conservées à -20 °C pendant deux mois au maximum.

3.5 Mode opératoire

Un résumé des conditions utilisées pour la préparation des solutions témoins et des solutions pour essais est présenté dans le Tableau 2.

3.5.1 Préparation des solutions témoins

Les solutions témoins sont préparées à partir d'une solution tampon d'acétate de sodium à pH 5.2 (3.4.3), dans laquelle sont ajoutées neuf concentrations croissantes d'Ochratoxine A afin d'obtenir par exemple 50 mL de chaque solution témoin supplémentée (cf. Tableau 2). Les additions sont réalisées avec les solutions de rajout (3.4.4.3). Deux répétitions sont réalisées par concentration. L'Ochratoxine A est ensuite analysée dans les neuf solutions témoins afin d'obtenir les concentrations initiales mesurées.

3.5.2 Préparation des solutions pour essais

Les 9 solutions enrichies en OTA (3.5.1) sont mises en contact avec la fibre végétale sélective.

Mode opératoire :

Ajouter 0,05 g de fibres végétales sélectives dans un petit volume de solution tampon d'acétate de sodium à pH 5.2 supplémentée par de l'OTA puis verser le mélange dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter à 25 mL avec cette même solution tampon (la dose de fibre végétale est de 2 g/L). Après 45 minutes de contact avec les fibres végatales sélectives sous agitation, centrifuger les suspensions et séparer le surnageant du culot de fibres. Cette opération est répétée pour les 9 solutions témoins supplémentées par de l'ochratoxine A (3.5.1). L'ochratoxine A est alors dosée par HPLC, afin d'obtenir les concentrations résiduelles mesurées dans le surnageant. Deux répétitions sont réalisées par concentration.

Tableau 2 - Résumé des conditions pour la détermination de la capacité d'adsorption de l'OTA

Temps de contact	45 minutes
Tampon utilisé pour les essais	Acétate de sodium (pH 5.2)
Fibres végétales sélectives	Dose 2g/L (solutions pour essais) Absence (solutions témoins)

Concentrations rajoutées en Ochratoxine A	2 µg/L 5 µg/L 20 µg/L 125 µg/L 450 µg/L 900 µg/L 2 000 µg/L 5 000 µg/L 10 000 µg/L
Nombre de répétitions	2
Centrifugation - paramètres	Température ambiante 10000 tours /minute (environ 13000 g) pendant 2.3 minutes
Méthode d'analyse de l'Ochratoxine A	Dosage de l'Ochratoxine A dans le vin après passage sur colonne d'immunoaffinité (OIV-MA-AS315-10), puis analyse par HPLC avec detection fluorimetrique

3.6 Calculs

La détermination de la capacité d'adsorption en Ochratoxine A est calculée d'après l'équation de Freundlich suivante :

$$CAds = KF * CRes^{1/n}$$

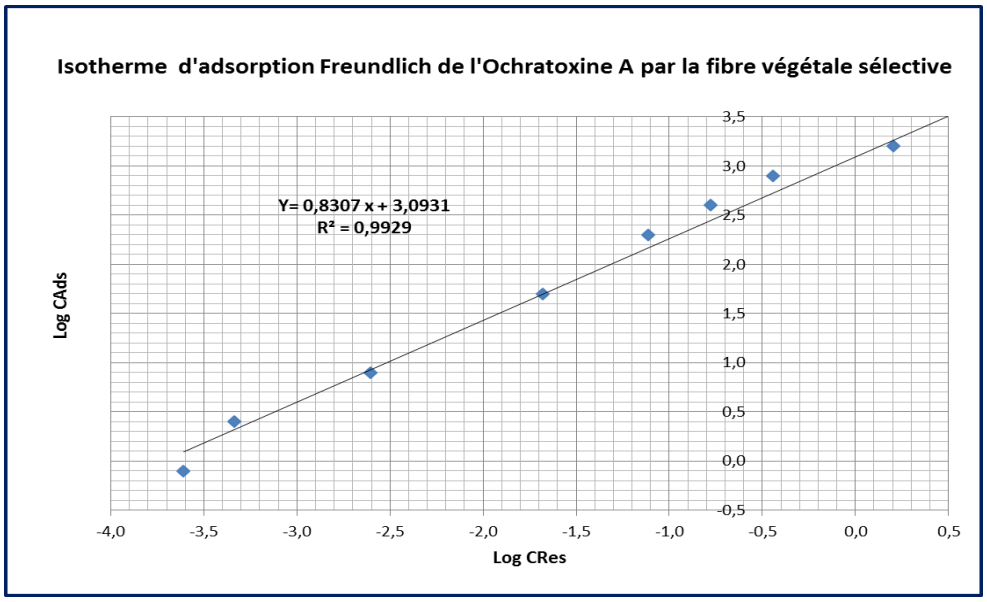
Ou sa forme linéaire : $\text{Log } CAds = 1/n \text{ Log } CRes + \text{Log } KF$

avec KF = capacité d'adsorption de la molécule par la fibre végétale sélective en µg/g de fibre
et n = affinité de la fibre végétale sélective pour la molécule
et où :

- **CRes = concentration résiduelle en µg/mL** d'Ochratoxine A, mesurée dans la solution d'essais après mise en contact avec les fibres végétales sélectives
- **CAds = la concentration adsorbée en µg/g** de fibres végétales sélectives
    - CAds en µg/g = CAds en µg /L / 2 (car dose adsorbant = 2 g de fibre/L de solution tampon)
    - **CAds en µg/L= concentration initiale en µg/L** mesurée dans la solution témoin (avant mise en contact avec les fibres végétales sélectives) **– Cres en µg/L**

A partir des concentrations résiduelles (µg/L) mesurées, les concentrations adsorbées (µg/L) en Ochratoxine A sont ainsi calculées pour chaque concentration initiale et la droite de régression **Log CAds = 1/n Log CRes + Log KF** est tracée. La régression d'adsorption Freundlich de l'Ochratoxine A par la fibre végétale sélective, permet ainsi de calculer les deux constantes de Freundlich : la capacité d'adsorption en µg/g (KF) et l'affinité de la fibre pour l'Ochratoxine A (n). L'équation de la droite, y = ax + b nous donne la pente a =1/n et b = Log KF.

Exemple: isotherme de Freundlich pour l'Ochatoxine A



Ainsi, dans l'exemple ci-dessus, on peut calculer :
b = Log KF = 3,0931 soit KF = 10^b = 1239,21
Et a = 1/n= 0,8307 soit n = 1 /a = 1,2
L'affinité (n) de la fibre végétale sélective pour l'Ochratoxine A est de 1,2 et
la capacité d'adsorption (KF) de l'Ochratoxine A par la fibre végétale sélective est de 1239,21 µg /g ou mg/kg de fibre.

ACIDE FUMARIQUE
acide trans-butènedioïque
acide trans-1,2-éthylène-dicarboxylique
COOH-CH=CHCOOH

N° CAS : 110-17-8
N° SIN : 297
OIV-OENO 690-2023

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

L'acide fumarique est produit naturellement chez les organismes eucaryotes par l'enzyme succinate-déshydrogénase à partir de succinate dans le complexe II de la chaîne de transport d'électrons, impliqué dans la production d'ATP. Le produit de qualité alimentaire peut être obtenu par synthèse chimique ou par bio synthèse. Il est employé pour contrôler la fermentation malolactique dans les vins, dans les conditions stipulées par la réglementation.
La production par synthèse chimique est la plus courante : il s'agit de l'isomérisation de l'acide maléique obtenu à partir de l'hydrolyse de l'anhydride maléique, produit à partir de l'oxydation du butane ou du benzène. La production par biosynthèse, plus durable, devrait se développer rapidement. Elle met en œuvre la fermentation, par notamment Rhizopus oryzae, de résidus agro-alimentaires (par ex., issus de pommes).
L'acide fumarique est préparé en solution dans un volume de vin avant son incorporation.

2. ÉTIQUETAGE

L'étiquette doit indiquer clairement que le produit est de l'ACIDE FUMARIQUE. Elle doit indiquer le numéro de lot, la date d'expiration, le taux de pureté en pourcentage (supérieur à 99 %) et les exigences de conservation et de sécurité.

3. CARACTÈRES

L'acide fumarique se présente sous forme de cristaux incolores blancs, parfois aciculaires, en prismes monocliniques ou en feuillets sous l'effet de l'eau, ou encore de poudre cristalline ou de granules. Il est inodore, sa saveur est acidulée et fruitée.
Le point de fusion est de 287 °C. L'intervalle de fusion est de 286 à 302 °C (tube capillaire fermé, chauffage rapide).

4. SOLUBILITÉ

Solubilité faible dans l'eau : - 6,3 g/L dans eau à 25 °C ;

- Solubilité bonne dans l'alcool : 98 g/100 g d'alcool à 95%vol. à 30°C ;
- Insoluble dans le chloroforme et le benzène ;
- Légèrement soluble dans les corps gras

5. CARACTÈRES D'IDENTITÉ

5.1. Acide 1,2-dicarboxylique

Placer 50 mg de l'échantillon dans un tube à essai, ajouter 2 à 3 mg de résorcinol et 1 mL d'acide sulfurique, agiter, chauffer à 130 °C pendant 5 min et laisser refroidir. Diluer dans de l'eau en complétant à 5 mL et ajouter goutte à goutte une solution d'hydroxyde de sodium (40 % m/m) afin de rendre la solution alcaline. Laisser refroidir puis diluer dans de l'eau en complétant à 10 mL. Une fluorescence bleu verdâtre est observée sous une lampe à ultraviolets.

5.2. Test de la présence de la double liaison

Ajouter 10 mL d'eau à 0,5 g d'échantillon puis dissoudre en portant à ébullition. Ajouter 2 ou 3 gouttes d'eau de brome à la solution encore chaude. La couleur de l'eau de brome disparaît.

6. ESSAIS

6.1. Préparation de la solution d'essai

Pour les essais de pureté, dissoudre 0,5% m/v d'acide fumarique dans une solution hydro-alcoolique à 10 %

6.2. Perte à la dessiccation

La perte après séchage à 120 °C pendant 4 heures ne doit pas être supérieure à 0,5 %.

6.3. Cendres sulfuriques

La teneur en cendres sulfuriques ne devrait pas être supérieure à 0,1 %. Réaliser l'essai sur 2 g d'échantillon. Calciner un creuset adéquat à 600 °C pendant 30 minutes, laisser refroidir dans un dessiccateur et procéder à sa pesée. Placer 2 g d'échantillon dans le creuset et peser. Humidifier l'échantillon avec une petite quantité d'acide sulfurique (habituellement 1 mL) et chauffer doucement à basse température jusqu'à carbonisation complète de l'échantillon. Après refroidissement, humidifier le résidu avec une petite quantité d'acide sulfurique, chauffer doucement jusqu'à ce que

les émanations de vapeur blanche cessent et calciner à 600 °C jusqu'à incinération complète du résidu. Laisser le creuset refroidir dans un dessiccateur, procéder de nouveau à sa pesée et calculer la masse du résidu.

6.4. Acide malique

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage de l'acide malique selon la méthode OIV-MA-AS313-04 du Recueil. La teneur en acide malique ne doit pas être supérieure à 0,1 %.

6.5. Chlorures

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage des chlorures par potentiométrie en utilisant une électrode Ag/AgCl selon la méthode OIV-MA-AS321-02 du Recueil. La teneur en chlorures, exprimée en acide chlorhydrique, doit être inférieure à 1 g/kg.

6.6. Sulfates

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage des sulfates selon la méthode OIV-MA-AS321-05A du Recueil. La teneur en sulfates, exprimée en acide sulfurique, doit être inférieure à 1 g/kg.

6.7. Fer

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage du fer selon la méthode OIV-MA-AS323-07 du Recueil. La teneur en fer doit être inférieure à 10 mg/kg.

6.8. Métaux lourds

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage des métaux lourds selon la méthode OIV-MA-AS323-07 du Recueil. La teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, doit être inférieure à 5 mg/kg.

6.9. Plomb

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage du plomb selon la méthode OIV-MA-AS323-07 du Recueil. La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

6.10. Mercure

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage du mercure selon la méthode OIV-MA-AS323-07 du Recueil. La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

6.11. Arsenic

Sur la solution préparée pour essai (6.1), procéder au dosage de l'arsenic selon la méthode OIV-MA-AS323-07 du Recueil. La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

7. ANALYSE QUANTITATIVE

Les acides organiques du vin peuvent être séparés et déterminés simultanément par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur des colonnes C18 avec détection UV à 210 nm, selon la méthode OIV-MA-AS313-04 de type IV du Recueil international des méthodes d'analyse.

8. CONSERVATION

L'acide fumarique doit être conservé dans des récipients hermétiquement clos.

SORBIQUE (ACIDE)
Acide trans,trans-hexa-2-4-diénoïque
CH_3 - CH = CH - CH = CH - COOH
$C_6H_8O_2$ = 112,1
N° SIN: 200
(Oeno 45/2000 modifiée par Oeno 4/2007)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit de la catégorie des conservateurs ayant une action antifongique **(voir sorbate de potassium**). N'étant pas soluble dans le vin, il ne peut pas être utilisé en l'état mais sous forme de son sel de potassium. Il peut être soluble dans certaines boissons spiritueuses.

Son emploi est soumis au respect de la teneur limite réglementaire.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner la pureté du produit, les conditions de conservation et de sécurité.

3. SOLUBILITE

Eau 20°C	1,6 g/l
Eau 100°C	38 g/l
Alcool	55 g/l
Ether éthylique	104 g/kg

Cet acide est entraînable par la vapeur d'eau; à 100°C, la vapeur a une concentration en acide sorbique égale à 59/100 de la concentration de la solution diluée bouillante.

Coefficient de partage éther éthylique/eau : 32.

4. CARACTERES D'IDENTITE

4.1 - Point de fusion = 134 ± 2°C. Point d'ébullition 228°C.

4.2 - Agiter 20 mg d'acide sorbique avec 1 ml d'eau de brome (R). La couleur doit disparaître.

4.3 - Une solution contenant 4 mg d'acide sorbique par litre d'eau contenant 0,5 g de carbonate monosodique par litre présente une bande d'absorption à 256 nm.

5. ESSAIS

5.1 Humidité

L'acide sorbique ne doit pas contenir plus de 0,5% de son poids en eau (Méthode Karl Fisher).

5.2 Cendres sulfuriques

Le taux des cendres sulfuriques déterminé suivant la méthode indiquée en annexe doit être inférieur à 0,2 p. 100.

5.3 Préparation de la solution pour essais

Agiter 0,5 g d'acide sorbique avec 70 ml d'eau bouillante. Laisser refroidir cette solution. Filtrer en Recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 ml, rincer le premier récipient, le précipité et le filtre par quelques millilitres d'eau, à plusieurs reprises, jusqu'à obtention de 100 ml de filtrat.

5.4 Sulfates

A 20 ml de la solution préparée pour essais (5.3), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10 P ; 100 (R), 2 ml de solution de chlorure de baryum (R). Le mélange doit être limpide ou l'opalescence observée après 15 minutes doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en sulfates, exprimée en acide sulfurique, inférieure à 1 g/kg).

5.5 Chlorures

A 10 ml de la solution préparée pour essais (5.3), ajouter 5 ml d'eau, 5 ml d'acide nitrique dilué à 10 p. 100 (R) et 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Le mélange doit rester limpide, ou l'opalescence observée après 15 minutes doit être inférieure à celle présentée par le témoin préparé comme il est indiqué en annexe. (Teneur en chlorures, exprimée en acide chlorhydrique, inférieure à 1 g/kg).

5.6 Métaux lourds

A 10 ml de la solution préparée pour essais (5.3), ajouter 2 ml de solution tampon pH 3,5 (R) et 1,2 ml de réactif au thioacétamide (R). Appliquer la méthode décrite en annexe. (Teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

5.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5.3), rechercher le plomb par la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 2 mg/kg).

5.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

5.9 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

5.10 Aldéhydes

Préparer une solution aqueuse saturée d'acide sorbique en agitant 1 g d'acide sorbique avec 35 ml d'eau très chaude. Laisser refroidir cette solution dans un flacon bouché. Filtrer en Recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 50 ml, rincer le flacon, le précipité et le filtre par quelques millilitres d'eau, à plusieurs reprises jusqu'à obtention de 50 ml de filtrat. Traiter 1 ml de cette solution avec 0,5 ml de solution de fuchsine décolorée par l'acide sulfureux (R) et comparer après 15 minutes à un tube témoin obtenu avec 0,5 ml du même réactif et 1 ml de formaldéhyde en solution à 20 µg par millilitre. La coloration devra être moins intense que celle du témoin. (Teneur en aldéhydes, exprimée en formaldéhyde, inférieure à 1 g/kg).

5.11 Dosages

Ces dosages doivent être faits avec de l'acide sorbique préalablement desséché dans un dessiccateur à acide sulfurique durant 24 heures.

1° Peser une quantité **p** d'acide sorbique voisine de 0,20 g et la dissoudre dans 10 ml d'alcool pur ; puis diluer dans 100 ml d'eau. Titrer l'acidité par la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium en présence de solution de phénolphtaléine (R). Soit **n** le nombre de millilitres employés.

1 ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M correspond à 0,0112 g d'acide sorbique.

Teneur p. 100 en acide sorbique du produit essayé :

$$\frac{1{,}12\ \mathbf{n}}{\mathbf{p}}$$

2° La même opération est faite après entraînement par la vapeur d'eau. Introduire 10 ml de solution alcoolique contenant une quantité **p** g d'acide sorbique, voisine de 0,2 g, dans le barboteur d'un appareil à entraînement par la vapeur d'eau ; ajouter un cristal (0,5 g environ) d'acide tartrique et distiller 250 ml au moins (jusqu'à ce que la vapeur n'entraîne plus d'acide). Titrer par la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium l'acidité distillée.

Selon ces deux dosages, le produit analysé doit titrer 98 p. 100 au moins d'acide sorbique.

6. CONSERVATION

L'acide sorbique doit être conservé en récipient étanche et hermétiquement clos.

CHLORURE D'ARGENT (I)
N° C.A.S.: 7783-90-6
(Oeno (505/2014)

(I) Le **chlorure d'argent utilisé pour le traitement du vin doit être adsorbé sur un support inerte**

1. Objet, origine et domaine d'application
Cette monographie concerne le chlorure d'argent utilisé pour être adsorbé sur un support inerte en vue de son utilisation dans le vin
Le chlorure d'argent est utilisé pour le traitement des vins afin d'éliminer les odeurs anormales liées à la fermentation et au stockage (odeurs causées par les phénomènes de réduction, caractérisées par la présence d'hydrogène sulfuré et de thiols).
Le sulfure d'argent formé au cours du traitement reste adsorbé sur le support inerte et l'ensemble peut être séparé par filtration.
Les matériaux de support inertes, comme par exemple le kieselguhr (terre de diatomées), la bentonite, le kaolin, etc. doivent être conformes aux prescriptions du Codex œnologique international.

2. Étiquetage
La concentration du produit, le numéro de lot, la date limite d'utilisation ainsi que les conditions de sécurité et de stockage doivent être indiqués sur l'étiquette.

3. Caractères
Le chlorure d'argent, à l'état pur, est une matière solide de couleur blanche.

4. Composition (analyses)
Le chlorure d'argent utilisé doit avoir une pureté minimum de 99 %.La détermination de la teneur en argent est effectuée selon la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) (7.8).
Le chlorure d'argent contenu dans le support inerte doit avoir une teneur supérieure ou égale à 2%

5. Identification du chlorure d'argent
Lors de l'exposition à la lumière, le chlorure d'argent subit une décomposition photolytique accompagnée d'un brunissement. Le chlorure d'argent est

partiellement soluble dans une solution ammoniacale à 3 %, (le bromure et l'iodure ne passent pas en solution à froid) puis l'adjonction consécutive d'une solution d'iodure de potassium entraîne la précipitation de l'iodure d'argent jaune (plus sensible à la lumière que l'AgCl). Une solution diluée d'hexacyanoferrate (III) de potassium rouge peut être ajoutée en alternative à l'iodure. Un précipité brun ($Ag_3[Fe(CN)_6]$) se forme.

6. Solubilité du chlorure d'argent

Dans de l'eau à 25 ºC : 0,00188 g/L.
Insoluble dans l'alcool et l'acide nitrique.
Soluble dans des solutions d'acide sulfurique, d'acide hydrochlorique, de thiosulfate et d'ammonium sous forme de complexes.

7. Essais

7.1 Préparation de la solution d'essais

Dans un bécher de 50 mL, placer 0,5 g de chlorure d'argent et 20 mL de solution de thiosulfate de sodium à 0,1 mol/L. Agiter pendant 30 minutes. Laisser ensuite reposer/sédimenter pendant 5 minutes. Filtrer le surnageant avec une seringue jetable et un filtre dont le diamètre des pores est de 0,45 µm. Transférer 0,5 mL du filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

7.2 Aspect de la solution d'essais

La solution doit être incolore, possiblement trouble. Le filtrat est incolore.

7.3 Fer

Détermination de la teneur selon la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) décrite au chapitre II du Codex Œnologique International ; teneur inférieure à 5 mg/kg.

7.4 Nickel

Détermination de la teneur selon la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) décrite au chapitre II du Codex Œnologique International ; teneur inférieure à 5 mg/kg.

7.5 Plomb

Détermination de la teneur selon la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) décrite au chapitre II du Codex Œnologique International ; teneur inférieure à 5 mg/kg.

7.6 Mercure
Détermination de la teneur selon la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) décrite au chapitre II du Codex Œnologique International ; teneur inférieure à 1 mg/kg.

7.7 Arsenic
Détermination de la teneur selon la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) décrite au chapitre II du Codex Œnologique International ; teneur inférieure à 3 mg/kg.

7.8 Argent
Détermination par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA), décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, après préparation d'une solution d'essai (7.1). Étalonnage avec des solutions de référence d'argent de 1 mg/L, 2,5 mg/L et 5 mg/L.

8. Stockage
Le chlorure d'argent doit être stocké au sec, protégé de la lumière dans des emballages hermétiquement fermés.

LAIT ECREME

(Oeno 7/2008)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le lait de vache écrémé peut être utilisé pour la clarification du vin. En se coagulant, il entraîne des particules à éliminer dans les sédiments. Il ne doit pas apporter d'odeurs étrangères au vin.

Son utilisation peut conduire à la présence éventuelle de protéines résiduelles dans le vin qui peuvent entraîner une possible réaction allergénique chez certains sujets.

Son utilisation doit satisfaire la réglementation en vigueur pour le lait écrémé

2. COMPOSITION ET LIMITES

Le lait écrémé doit satisfaire la réglementation en vigueur concernant les produits alimentaires destinés à l'alimentation humaine.

BILLES ADSORBANTES DE STYRÈNE – DIVINYLBENZÈNE

N° CAS 9003-69-4

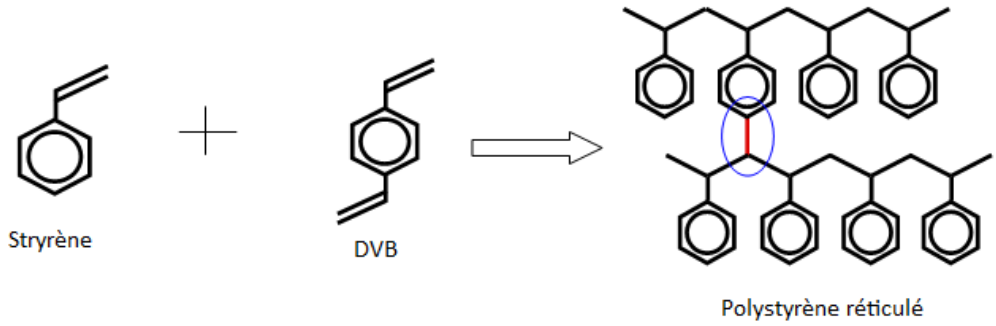
1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les billes adsorbantes permettent la réduction ou l'élimination des déviations organoleptiques caractérisées « moisis-terreux » par un procédé physique d'adsorption.
Les billes adsorbantes sont placées dans des colonnes répondant aux normes du contact alimentaire pour permettre la percolation du moût ou du vin conformément aux fiches décrites dans le Code des pratiques œnologiques de l'OIV. Elles adsorbent les molécules malodorantes dont les dimensions sont inférieures à celles de la taille de leurs pores. L'effet recherché est atteint par la combinaison du volume de billes du copolymère de styrène-divinylbenzène déterminé par la taille des pores et la vitesse de passage du moût ou du vin sur les billes. Contrairement aux traitements des jus de fruits avec ces mêmes billes, les débits pour cette application sont extrêmement rapides.

2. COMPOSITION

Les billes adsorbantes de styrène-divinylbenzène doivent être fabriquées selon les bonnes pratiques de fabrication à partir des substances suivantes : styrène ou éthénylbenzène ou vinylbenzène N° CAS : 100-42-5 et divinylbenzène ou diéthénylbenzène N° CAS : 1321-74- 0 faisant partie des substances approuvées pour une utilisation dans les matières et articles destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. C.F 1 : références

Elles sont produites par polymérisation du divinylbenzène (DVB) en présence de styrène (ou vinylbenzène) comme agent de réticulation, la concentration initiale du Styrène peut varier de 0,5% à un maximum de 40%



Le copolymère de styrène-divinylbenzène réticulé est complètement insoluble. Il constitue dans la majorité des cas, le squelette des résines échangeuses d'ions ou des membranes d'électrodialyse avant leur greffage.
Les billes adsorbantes ont une granulométrie comprise entre 600 et 750 micromètres et développent une surface spécifique supérieure ou égale à 700 m2/g avec des diamètres de pores compris entre 1 et 40 nm maximum.
L'inertie des billes du copolymère de styrène-divinylbenzène doit être satisfaite.
Les billes adsorbantes doivent subir un prétraitement ou pré-conditionnement par le fournisseur, à l'éthanol absolu (à 100 % vol) afin d'éliminer les monomères résiduels. Elles doivent être lavées et conditionnées avant utilisation, conformément aux instructions du fabricant.

3. ETIQUETAGE

Les principales caractéristiques doivent être indiquées sur l'étiquette, notamment le numéro de lot, la date de péremption et les conditions de conservation.

4. CARACTERES

Elles se présentent sous la forme de billes blanches poreuses inodores. Elles sont préparées et conditionnées sous forme humide dans 30 à 40 % d'eau, éventuellement additionnée de chlorure de sodium, afin d'éviter tout desséchement.

5. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

5.1 Généralités

Les billes adsorbantes du copolymère styrène-divinylbenzène ou résines non greffées, utilisées dans le traitement des denrées alimentaires doivent répondre aux impératifs suivants :

- elles ne doivent pas transférer leurs constituants dans les denrées alimentaires en quantités qui pourraient mettre en danger la santé de l'homme, ou entraîner une modification inacceptable de la composition des denrées alimentaires ou une altération de leurs caractéristiques organoleptiques ;
- la détermination du relargage des substances organiques (dosage du carbone organique : COT) et les tests de migration des constituants spécifiques sont effectués par le fabricant en utilisant les "simulateurs d'aliments" dans les "conditions conventionnelles d'essai de migration". Ces tests sont obligatoires pour obtenir toute autorisation de mise en marché de résines ou des billes adsorbantes du copolymère styrène-divinylbenzène ou de tout matériau en contact.
- l'application au moût et au vin des billes adsorbantes du copolymère styrène-divinylbenzène impose de déterminer la migration des constituants spécifiques des billes à l'aide de 3 simulants. La détermination de la migration des constituants spécifiques doit être conduite avec les simulants suivants : l'eau, l'acide acétique à 3% (p/v) et l'éthanol à 20% vol. Des concentrations supplémentaires peuvent être testées pour répondre à des applications sur des produits particuliers (ex vins de liqueur…).
- le temps de contact pour les tests de migration est de 4 h, il est très largement supérieur au temps de contact du moût ou du vin dans les conditions du traitement qui ne dépasse pas quelques minutes.

5.2 Dosage du Carbone Organique Total (COT)

5.2.1 Réactifs de contrôle

- Eau d'essai distillée et/ou désionisée ayant une conductivité inférieure à 20 µS/cm à 25 °C et une teneur en COT inférieure à 0,2 mg/L.

5.2.2 Protocole

- Préparer 1 colonne et récupérer 100 mL d'eau d'essai de cette colonne pour un essai à blanc, la teneur en COT (Cb) doit être inférieure à 0,5 mg/L.
- Préparer 100 ml de billes adsorbantes dont on aura déterminé le poids.

Tout en maintenant la température maximale qui pourra être rencontrée lors de l'utilisation (par ex 20 °C).

- introduire 100 mL d'eau d'essai dans chaque colonne, ajouter progressivement les billes adsorbantes qui doivent être immergées jusqu'à un volume de 100 mL. Après sédimentation vibrer la colonne pour tasser la résine jusqu'à volume constant par un tapotement latéral.
- Percoler 2 L d'eau d'essai à travers la résine, à un débit de 1000 mL par heure.
- Maintenir en stagnation pendant 24 heures.
- Collecter 5 fractions successives de 100 mL de l'eau d'essai ayant percolé à travers de 100 mL de billes adsorbantes à un débit de 500 mL/h.
- Procéder à l'analyse du COT sur les 5 fractions collectées et sur l'essai à blanc (Cb) en utilisant un analyseur automatique de COT.

5.2.3 Résultats

La somme des résultats des analyses du COT de chaque collecte déduite de la valeur du COT d'essai à blanc ne doit pas dépasser 10 mg/L (critères d'acceptabilité).

5.3. Test de migration des constituants spécifiques : styrène et divinylbenzène

5.3.1 Objectif

Vérifier que le profil d'impuretés organiques ou constituants spécifiques des billes adsorbantes après prétraitement du fabricant est conforme :

a/ estimer la quantité totale d'impuretés organiques volatiles (styrène et divinylbenzène) présentes sur les billes adsorbantes.
b/ estimer la part de ces impuretés pouvant migrer dans une solution ayant un pouvoir extractant (solvants ou simulants) comparable à celui du moût et du vin.

5.3.2 Solvants ou simulants requis

Les solvants suivants sont requis

- Eau d'essai : eau distillée et/ou désionisée ayant une conductivité inférieure à 20 µS/cm à 25°C et une teneur en COT inférieure à 0,2 mg/L
- Alcool éthylique à 20 % vol. obtenu à partir d'alcool éthylique absolu et d'eau distillée et/ou désionisée

- Acide acétique à 3 % réalisé par un mélange de 3 parties, en masse, d'acide acétique avec 97 parties en masse d'eau distillée et/ou désionisée.

5.3.3 Protocole

- Préparer 1 colonne par simulant et prélever 100 ml d'eau d'essai de cette colonne pour un essai à blanc.
- Préparer 100 mL de billes adsorbantes dont on aura déterminé le poids.
- Tout en maintenant la température maximale qui pourra être rencontrée lors de l'utilisation (par ex 20 °C).
- Introduire 100 mL d'eau d'essai dans chaque colonne, ajouter progressivement les billes adsorbantes qui doivent être immergées jusqu'à un volume de 100 mL. Après sédimentation, tasser la résine jusqu'à volume constant par un tapotement latéral.
- Passer à travers les résines, à un débit de 1000 mL par heure, 2 L d'eau d'essai et de chaque solvant ou simulant.
- Maintenir en stagnation pendant 4 heures.
- Collecter 5 fractions successives de 100 mL de simulant ayant percolé à travers de 100 mL de billes adsorbantes à un débit de 500 mL/h.
- Procéder à l'analyse des constituants spécifiques sur les 5 fractions collectées de chaque simulant, de l'eau d'essai et sur l'essai à blanc suivant la méthode décrite en annexe 1.

5.3.4 Résultats

Les limites de migration spécifique (LMS) sont celles de limite de détection analytique soit pour le divinylbenzène, LMS = non détecté (ND) sachant que la LD : 0,02 mg/kg

6. LIMITES D'UTILISATION

- Le traitement ne doit pas changer les caractères organoleptiques du vin.
- Le traitement ne doit pas modifier visiblement la couleur du vin.
- Le traitement ne doit pas diminuer de manière significative la concentration des cations métalliques dans le vin.
- Le traitement ne doit pas modifier de manière significative le pH du moût ou du vin.

- La résine ne doit pas donner au vin ou au moût des substances qui pourraient l'altérer.
- La diminution du titre alcoométrique du vin ne doit pas être supérieure à 0,1 %.

L'opérateur peut utiliser des agents conditionnants et/ou régénérants composés d'eau et d'acides inorganiques, bases ou sels à condition que la résine conditionnée ou régénérée soit rincée à l'eau jusqu'à élimination complète des agents conditionnants et régénérants avant l'introduction du moût ou du vin.

7. DETERMINATION DU VOLUME DES BILLES ADSORBANTES (BED VOLUME) ET DU DEBIT DU MOUT OU DU VIN A TRAITER (BV/h)

Il est recommandé de procéder à des tests en laboratoire afin de déterminer les quantités de billes et le débit à appliquer à transposer au traitement en grand volume.

7.1 Matériel

- Colonne de chromatographie, de diamètre de 10 mm et d'une longueur de 250 mm avec aux extrémités 2 frittés en PTFE de diamètre de pores de 50 µm.
- Une pompe péristaltique.
- 5 L ou 10 L de moût ou vin contaminé en géosmine par essai.
- Billes adsorbantes du copolymère styrène/divinylbenzène.

7.2 Méthode

Pour déterminer le débit optimal d'élimination de la géosmine (BV/h), le test est appliqué sur un volume de 5 ou 10 mL de billes (BV) ce qui correspond réciproquement à un volume de vin ou de moût à traiter de 5 ou 10 litres afin d'avoir un ratio résine/volume de vin ou de moût à traiter de 1000. Le débit optimal se situe dans une fourchette de 150 à 250 BV/h.

Le moût à traiter devra subir une dégradation préalable de ses pectines et à une filtration de façon à présenter une turbidité inférieure à 10 NTU afin de ne pas obstruer les pores des billes.

- les billes adsorbantes sont lavées abondamment à l'eau (eau osmosée) puis sont placées dans la colonne et tassées par tapotement sur la colonne.
- Le vin ou le moût est introduit dans la colonne à l'aide de la pompe péristaltique à un débit prédéterminé. Le débit de sortie du vin est contrôlé toutes les 30 minutes à l'aide d'une burette graduée, pour s'assurer que la résine ne se colmate pas. Après traitement, Le contrôle du SO_2 libre et du SO2 total est effectué, pour réajuster, si besoin, leur teneur dans le vin.
- Pour vérifier que le traitement n'a pas d'impact négatif sur le moût ou le vin, des analyses sont effectuées sur les 5 ou 10 litres traitées (Tableau 1).

-	rouges	blancs
Titre alcoomètrique	X sur vin	X sur vin
Sucres résiduels	X sur vin	X sur vin
Sucres totaux	X sur moût	X sur moût
Acidité volatile	X	X
Acidité totale	X	X
pH	X	X
SO2 libre et total	X	X
DO 280nm	X	X
DO 320nm	X	X
DO 420nm ou CIELAB	X	X
DO 520nm ou CIELAB	X	
DO 620nm ou CIELAB	X	

Tableau 1 : Analyses à effectuer avant et après traitement

La quantité de billes adsorbantes et le débit seront réajustés en fonction du taux d'élimination de la géosmine donné par l'analyse (méthode SPME GC-MS, (méthode interne laboratoires accrédités COFRAC) ou par simple dégustation si le traitement est urgent, confirmé ensuite par analyse.

8. REGENERATION

Les billes adsorbantes peuvent être régénérées cinq fois maximum, après passage du volume total ou partiel du moût ou du vin.

La régénération est réalisée dans la colonne par passage d'une solution d'hydroxyde de sodium 4 M avec un débit le plus lent possible selon le type de pompe (par exemple de 20 BV/h).
Le rinçage s'effectue avec de l'eau potable de pH connu (pH initial), jusqu'à élimination de l'hydroxyde de sodium ; Le contrôle du rinçage se fait par mesure du pH de l'eau de rinçage qui doit être identique au pH initial.

9. CONDITIONS D'UTILISATION

La conservation, l'utilisation des billes adsorbantes ainsi que leur régénération et leur élimination en tant que déchets doivent être effectuées selon les techniques admises pour les matériaux en contact. Le fournisseur est tenu d'apporter toutes les informations nécessaires pour leur emploi et leur régénération. Selon la législation en vigueur , les billes adsorbantes sont déposées dans des centres agrées de traitement des déchets industriels à des fins de recyclage notamment par dépolymérisation.

10. REFERENCES

- Règlement (CE) n° 1935/2004
- Règlement (UE) n° 10/2011 modifié, tableau 1 annexe1
- FDA regulations as found in Title 21 of the Code of Federal Regulations (CFR), Part 173 – Secondary Direct Food Additives permitted in food for human consumption, §173.65

Annexe 1

Dosage du styrène et du divinylbenzène dans les vins (Méthode de type IV)

Avertissement

Il convient que l'utilisateur de la présente publication connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente publication n'est pas censée aborder les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer du respect de la réglementation nationale en vigueur et de l'environnement.

1. Domaine d'application

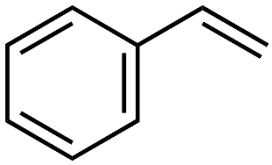
TEST DE MIGRATION DES CONSTITUANTS SPECIFIQUES

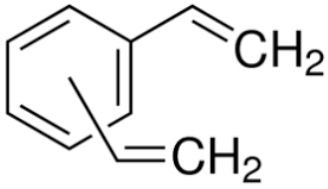
2. Objectif

Vérifier que le profil d'impuretés organiques ou constituants spécifiques des billes adsorbantes après prétraitement du fabricant est conforme

a/ estimer la quantité totale d'impuretés organiques volatiles présentes sur les billes adsorbantes

b/ estimer la part de ces impuretés pouvant migrer dans une solution ayant un pouvoir extractant (solvants ou simulants) comparable à celui du moût et du vin





Styrène Divinylbenzène

Le divinylbenzène existe sous 3 formes : ortho, méta et para.

3. Références normatives

ISO 78-2 : Chimie – Plans de normes

4. Principe de la méthode

La méthode utilisée est la chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse. L'extraction de l'échantillon se fait en espace de tête par la technique de micro-extraction sur phase solide (SPME). L'échantillon de vin/moût est préparé par introduction dans un flacon SPME de 2 g environ de NaCl dans 10 mL de vin/moût et 50 µL d'une solution d'heptanoate d'éthyle (standard interne) à 20 mg/L. Le flacon est fermé et agité pendant 5 minutes. Le standard interne utilisé ici l'est à titre d'exemple, et d'autres standards internes sont possibles.

Pour la mesure, six points de calibrage sont utilisés à partir d'une solution mère contenant l'ensemble des molécules étudiées.

5. Réactifs et solutions de travail

Au cours de l'analyse, sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée, ou de l'eau de pureté équivalente

5.1. Réactifs

5.1.1. Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité I ou II.
5.1.2. Ethanol; (CAS 64-17-5)
5.1.3. Chlorure de sodium; (CAS 7647-14-5)
5.1.4. Heptanoate d'éthyle; (CAS 106-30-9)
5.1.5. Divinylbenzène; (CAS 1321-74-0)
5.1.6. Styrène; (CAS 100-42-5)

5.2. Solutions de travail

Des solutions mères individuelles à 1 g/L sont préparées dans l'éthanol pour chaque molécule ainsi que pour l'étalon interne (heptanoate d'éthyle).

A partir des solutions mères individuelles, des solutions filles mélanges sont préparées dans l'éthanol aux concentrations souhaitées afin de pouvoir couvrir l'ensemble de la gamme de mesure.

5.3. Solutions de calibrage

Afin d'assurer le raccordement au plus près au système international d'unité (S.I.) la gamme de calibrage doit être réalisée avec des solutions à 12% v/v d'éthanol (5.1.2) couvrant en 6 points la gamme de mesure (de 1 à 100 $\mu g.L^{-1}$). Ces solutions sont préparées au moment de l'analyse et à usage unique.
L'équation de calibrage est une équation du second degré.

6. Appareillage

L'appareillage est donné à titre d'exemple. La technique GC/MS utilisée permettant des variantes ou des optimisations nécessaires à chaque configuration matérielle.

6.1. GC-MS équipé d'un injecteur "split – splitless" et d'un détecteur à spectromètre de masse.
6.2. Colonne capillaire de phase stationnaire apolaire, 5 % phénylmethylpolysiloxane (ex : HP-5MS, 30m x 0,25 mm x 0,25 µm de film) ou équivalente.
6.3. Microseringues 100 µL, 1 µL et 10 µL étalonnées.
6.4. Vial SPME de 20 mL, fermant avec une capsule perforée, et opercule à face téflonée.
6.5. Système de microextraction sur phase solide (SPME), avec fibre revêtue d'un film de polydiméthylsiloxane de 100 µm d'épaisseur.
6.6. Balance
Celle-ci doit avoir une précision de 0.1 mg.
6.7. Verrerie de mesure
Les verreries de mesure pour la préparation des réactifs et des solutions de calibrage sont de classe A.

7. Echantillonnage

7.1. Echantillons pour essais

10 mL de vin/moût sont placés dans un vial SPME en verre de 20 mL (6.4), avec 2 g environ de NaCl (5.1.3), et 50 µL d'une solution d'heptanoate d'éthyle (standard interne) à 20 mg/L (5.1.4).
Le vial est scellé avec une capsule perforée et opercule à face téflonée (6.4).

8. Mode opératoire GC/MS

8.1. Extraction

L'extraction Head Pace – SPME se fait pendant 25 minutes à température ambiante.

8.2. Injection

La désorption de la fibre se fait pendant 10 minutes dans l'injecteur
Injecteur à 260°C en mode splitless
Débit hélium : 2 mL/min

8.3. Paramétrage chromatographe en phase gazeuse

Colonne : 5MS UI 30m x 0,25mm x 0,25µm

Ligne de transfert : 300°C
Four : 45°C
Puis 2°C/min jusqu'à 80°C
Puis 3°C/min jusqu'à 92°C
Puis 40°C/min jusqu'à 300°C
Puis 300°C pendant 2 minutes
Temps de run : 28,7 minutes

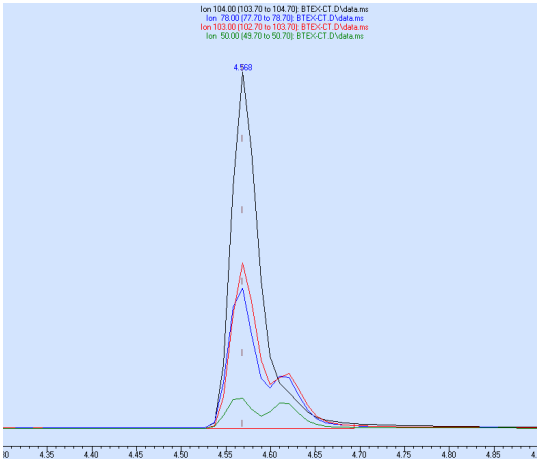
8.4. Acquisition

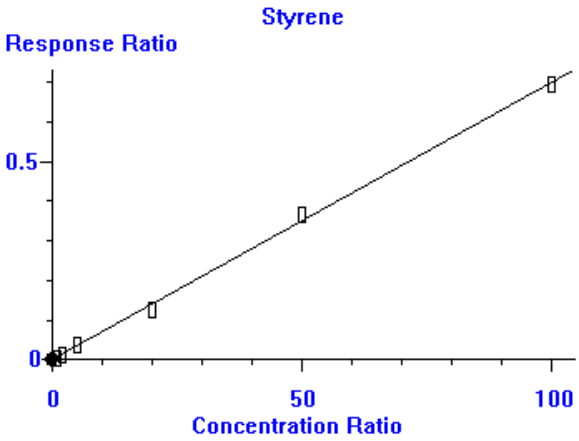
Température source : 230°C
Température quad : 150°C
Acquisition : SIM

	Tr (min)	Ions Quanti	Ions Quali
Heptanoate d'éthyle	15,0	88	113 / 101 / 158
Styrène	5,0	104	78 / 103 / 50
m,p-Divinylbenzène	15,4 & 16,1	130	128 / 115

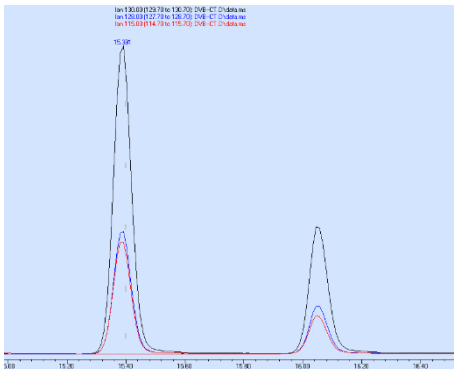
9. Résultats

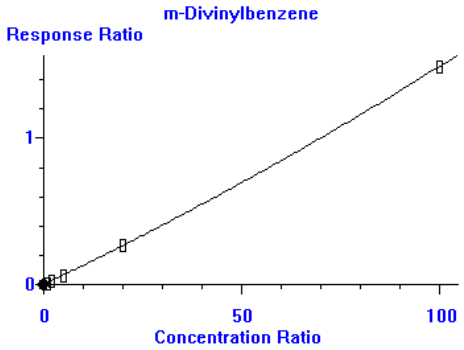
Exemple de chromatogramme et de courbe de calibration pour le styrène





Exemple de chromatogramme et de courbe de calibration pour le divinylbenzène





10. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en µg/L.

THIAMINE (CHLORURE DE CHLORHYDRATE DE)
3-[(4-amino-2-méthyl-5-pyrimidinyl)méthyl]-5-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylthiazolium (chlorure de chlorhydrate de)
Thiamini hydrochloridum
$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ = 337,3
(Oeno 50/2000)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Produit destiné à favoriser la fermentation alcoolique.
Son emploi est soumis au respect de l'apport limite en thiamine fixée par la réglementation.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner le taux de pureté, la date limite d'utilisation et les conditions de sécurité et de conservation.

3. CARACTERES

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, d'odeur faible caractéristique, facilement soluble dans l'eau, soluble dans le glycérol, peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans le chloroforme et dans l'éther éthylique.

4. SOLUBILITE

Eau à 20°C	1000 g/l
Alcool à 95 % vol.	12,5 g/l
Glycérol	63,3 g/l
Ether éthylique	insoluble

5. IDENTIFICATION

L'identification **5.1** peut être omise quand les identifications **5.2** et **5.3** sont effectuées. L'identification **5.2** peut être omise quand les identifications **5.1** et **5.3** sont effectuées.(méthodes décrites en annexe)

5.1 - Examiner le chlorhydrate de thiamine par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge

Les valeurs maximales de l'absorption du spectre obtenu avec la substance à examiner correspondent en position et en intensité relative à ceux du spectre obtenu avec le chlorhydrate de thiamine SCR. Si les spectres présentent des différences, dissoudre respectivement la substance à examiner et la substance chimique de référence dans de l'eau. Evaporer les solutions à siccité et préparer de nouveaux spectres à partir des résidus obtenus.

5.2 - Dissoudre 20 mg environ de chlorhydrate de thiamine dans 10 ml d'eau. Ajouter 1 ml d'acide acétique dilué (R) et 1,6 ml d'hydroxyde de sodium 1 M. Chauffer sur bain d'eau à 100°C pendant 30 minutes et laisser refroidir. Ajouter 5 ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium (R), 10 ml de solution d'hexacyanoferrate(III) de potassium (R), 10 ml de butanol et agiter énergiquement pendant 2 minutes. Dans la couche alcoolique, il se développe une fluorescence bleu clair intense, particulièrement en lumière ultraviolette à 365 nm. Répétez l'essai avec 0,9 ml d'hydroxyde de sodium 1 M et 0,2 g de sulfite de sodium remplaçant les 1,6 ml d'hydroxyde de sodium 1 M. Pratiquement aucune fluorescence n'est observée.

5.3 - Le chlorhydrate de thiamine donne la réaction (a) des chlorures.(méthde décrite en annexe)

5.4 - Le chlorhydrate de thiamine contient au minimum 98,5 p. 100 et au maximum l'équivalent de 101,5 p. 100 de chlorure de chlorhydrate de 3-[(4-amino-2-méthyl-5-pyrimidinyl)méthyl]-5-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylthiazolium, calculé par rapport à la substance anhydre.

6. ESSAIS

6.1 Perte à la dessiccation

Placer 2 g de thiamine dans une étuve à 105°C pendant 3 heures. La perte de poids ne doit pas être supérieure à 5 p. 100.

6.2 Cendres sulfuriques

Opérer sur 2 g de chlorure de chlorhydrate de thiamine selon la méthode décrite en annexe. Le taux de cendres sulfuriques ne doit pas être supérieur à 0,1 p. 100.

6.3 Préparation de la solution pour essais

Dissoudre 5 g de chlorhydrate de thiamine dans de l'eau et compléter à 100 ml.

6.4 Détermination du pH.

Le pH de la solution préparée pour essais (5.3) diluée au demi doit être compris entre 2,7 et 3,3.

6.5 Nitrates

A 1 ml de la solution préparée pour essais (5.3), ajouter 1 ml d'eau, 1 ml d'acide sulfurique concentré (R) ; refroidir. Déposer à la surface du liquide 2 ml de solution de sulfate de fer(II) à 5 p. 100 (R) préparée extemporanément. Il ne doit pas se former d'anneau brun à l'interface des 2 couches.

6.6 Métaux lourds

Sur 10 ml de la solution préparée pour essais (5.3), effectuer la recherche des métaux lourds selon la méthode décrite en annexe. (Teneur en métaux lourds, exprimée en plomb, inférieure à 10 mg/kg).

6.7 Plomb

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser le plomb selon la méthode décrite au Recueil. (Teneur en plomb inférieure à 5 mg/kg).

6.8 Mercure

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser le mercure selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 1 mg/kg).

6.9 Arsenic

Sur la solution préparée pour essais (5.3), doser l'arsenic selon la méthode décrite en annexe. (Teneur inférieure à 3 mg/kg).

7. DOSAGE

Dissoudre 0,150 g de chlorhydrate de thiamine dans 5 ml d'acide formique anhydre. Ajouter 65 ml d'acide acétique anhydre, puis, en agitant, 10 ml de solution d'acétate mercurique. Effectuer le dosage des sels halogénés de bases organiques en milieu non aqueux en titrant par l'acide perchlorique 0,1 M. Déterminer le point d'équivalence par potentiométrie

1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 16,86 mg de $C_{12}H_{18}C1_2N_4OS$.

8. CONSERVATION

Le chlorhydrate de thiamine doit être conservé en récipient non métallique, bien fermé et à l'abri de la lumière.

MEMBRANES D'ULTRAFILTRATION
(Oeno 481-2013)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Membrane appartenant à la famille des membranes poreuses, elles peuvent être organiques ou inorganiques, généralement sont de type anisotrope (asymétrique) ou composite; leur géométrie peut être spiralés ou «spiral wound», film plat ou «frame and plate», tubulaire, à fibres creuses.
L'ultrafiltration est un procédé de séparation physique qui s'applique à la séparation de particules de 0,001 à 0,1 µm avec une rétention des macromolécules et d'agrégats colloïdaux.
Les membranes d'ultrafiltration sont caractérisées par la rétention de macromolécules étalons de masses molaires connues. Le seuil de coupure nominal (ou MWCO pour molecular weight cut-off) est défini comme la masse molaire d'une macromolécule de la gamme étalon qui serait retenue à 90 ou 95 %.
La couche active des membranes d'ultrafiltration est constituée d'un matériau organique ou inorganique présentant une structure microporeuse avec des diamètres de pores de l'ordre du nanomètre.

2. PRINCIPE DU PROCEDE

C'est une méthode physique de filtration permettant de retenir les particules et les macromolécules du moût ou du vin, à l'aide d'une membrane semi-perméable sous l'action d'un gradient de pression, à température ambiante.

Le processus est conduit en flux tangentiel. L'appareillage est constitué essentiellement d'une pompe dite « de gavage » alimentant une pompe de circulation entre 2 et 10 bars, d'un bloc membrane et des appareils de contrôle, débitmètre, indicateur et régulateur de pression, etc..

3. COMPOSITION

Tous les matériaux mis en œuvre dans la procédure sont en conformité avec la réglementation relative aux matériaux au contact des aliments (tuyaux, pompes, matériel de contrôle, joints, etc..).

Ces membranes sont le plus souvent préparées par polymérisation *in situ* d'un polymère sur la surface d'un substrat poreux. La couche mince sert de membrane discriminante, tandis que le substrat poreux sert de support physique.
Les principaux polymères organiques utilisés peuvent être par exemple: Acétate de cellulose, Polyacrylonitrile, Polyamide, Polysulfone, Polyimide …

Les membranes minérales sont le plus souvent des matériaux composites, le support étant différent de la couche active. Elles n'existent qu'en membranes planes ou tubulaires. Pour les supports les céramiques composent la majorité des membranes, mais également du carbone poreux et des oxydes métalliques. Les couches actives sont souvent constituées d'alumine, de zircone ou d'oxyde de titane (cas de céramiques).

4. ETIQUETAGE

Les principales caractéristiques doivent être indiquées sur l'étiquette, notamment le numéro de lot.

5. FABRICATION

Par divers procédés, il est possible d'obtenir toute la gamme de taille de pores (de la MFT à la membrane dense de l'OI).
Les caractéristiques finales (épaisseur, porosité, taille de pores, structure interne) de la membrane dépendent d'un grand nombre de paramètres (choix du ternaire solvant/polymère/non-solvant, composition du collodion, ajout de porogènes, conditions opératoires – Température, vitesse de coulage, diamètre/épaisseur du collodion…)

Pour les membranes minérales, la couche active est généralement obtenue par la méthode sol-gel, puis déposée sur le support solide. L'étape finale est un frittage (entre 400 et 1200 °C) qui permet d'ajuster le diamètre moyen des pores de la membrane à partir de la granulométrie de la poudre initiale.

6. NETTOYAGE DES MEMBRANES

L'utilisateur peut employer des produits inorganiques autorisés par la réglementation, à condition de terminer l'opération par un rinçage à l'eau permettant une élimination complète du produit de nettoyage avant l'introduction du moût ou du vin.

7. LIMITES

- Tous les matériaux au contact doivent respecter les normes en vigueur.
- Aucune altération des caractères organoleptiques du moût ne doit être perceptible. Tout relargage éventuel de produit ou dérivé constituant la membrane doit respecter les normes en vigueur de migration spécifique des différents constituants des matériaux.

8. CONTRAINTES PARTICULIERES

La membrane doit répondre aux exigences réglementaires des matériaux en contact alimentaire.

MORCEAUX DE BOIS DE CHENE
(Oeno 3/2005, Oeno 430/2010, Oeno 406/2011)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Morceaux de bois de chêne utilisés pour l'élaboration des vins et pour transmettre au vin certains constituants issus du bois dans les conditions fixées par la réglementation.
Les morceaux de bois doivent provenir exclusivement des espèces du *Quercus*

Ils sont soit laissés à l'état naturel, soit chauffés de manière qualifiée de légère, moyenne ou forte mais ils ne doivent pas avoir subi de combustion y compris en surface, ne pas être charbonneux, friables au toucher.
Ils ne doivent pas être additionnés d'un quelconque produit destiné à augmenter leur pouvoir aromatisant naturel ou leurs composés phénoliques extractibles.
Ils ne doivent pas avoir subi de traitements chimique, enzymatique ou physique autres que le chauffage.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit mentionner l'origine de la ou des espèces botaniques de chêne et l'intensité du chauffage éventuel, les conditions de conservation et les consignes de sécurité

3. DIMENSIONS.

Les dimensions de ces particules doivent être telles qu'au moins 95 % en poids soit retenues par le tamis dont les mailles sont de 2 mm (soit 9 mesh).

4. PURETE

Les morceaux de bois de chêne ne doivent pas libérer de substances dans des concentrations qui pourraient induire d'éventuels risques pour la santé.

5. CONSERVATION

Les morceaux de bois de chêne doivent être conservés dans des locaux suffisamment secs et exempts d'odeurs susceptibles de les contaminer.

6. INTRODUCTION DANS LE VIN

En cas d'utilisation de sacs ou autres récipients pour introduire des morceaux de bois de chêne ainsi que des dispositifs de support dans le vin, ceux-ci doivent être constitués de matériaux approuvés "qualité alimentaire" dans le pays d'utilisation et ne libérant dans le vin aucune substance à des concentrations susceptibles de nuire à la santé ou d'affecter la qualité du produit final.

ANNEXE A

Méthode pour la détermination de la taille

des morceaux de bois de chêne par tamisage

Resolution OIV-Oeno 406-2011

1. Introduction

L'utilisation de morceaux de bois de chêne, dénommés communément copeaux, pour traiter le vin est autorisée sous réserve qu'ils respectent les spécifications du Codex œnologique (résolution oeno 3/2005). En particulier, les copeaux mis en œuvre doivent répondre à une exigence en matière dedimensions. Il est précisé que «les dimensions des particules sont telles qu'au moins 95% en poids sont retenues par le tamis dont les mailles sont de 2 mm (soit 9 mesh) ». Le mode opératoire suivant donne une méthode de division de l'échantillon puis de tamisage permettant de vérifier cette exigence.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique aux échantillons de plus 0,5 kg de copeaux de bois.

3. Principe

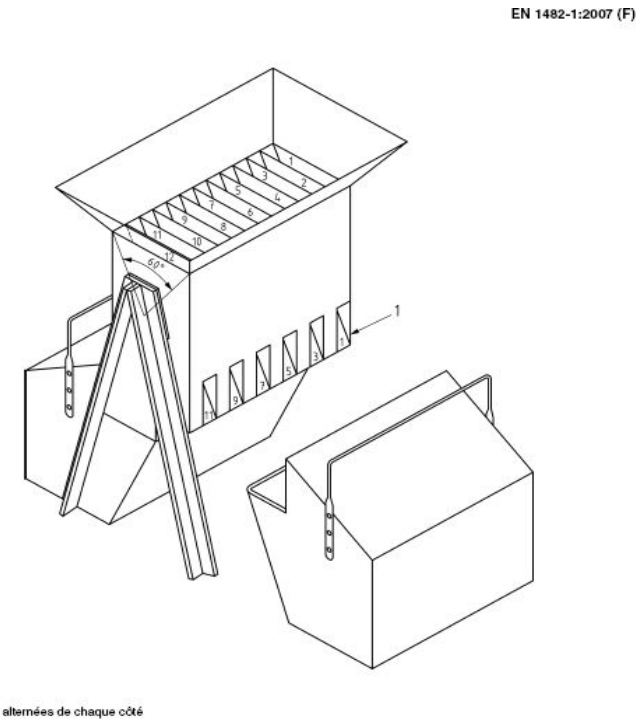
Après division de l'échantillon de départ, une quantité connue de copeaux (200 g environ) est placée sur un tamis vibrant. La pesée des copeaux restants sur le tamis après agitation permet de déterminer le pourcentage en poids de particules retenues par le tamis.

4. Matériel

- Matériel courant de laboratoire.
- Tamis de maille carrée de 2 mm (soit 9 mesh), de 30 cm de diamètre, monté sur un plateau vibrant muni d'un bac de récupération.

- Balance permettant des pesées à 0,1 g près.

- Diviseur d'échantillon à fentes (voir figure ci-dessous a titre indicatif).



Diviseur d'échantillon à fentes (EN 1482-1 : 2007) Schéma donné a titre Indicatif

5. Division de l'échantillon

Lorsqu'il est nécessaire de réduire la taille de l'échantillon pour obtenir des "sous-échantillons" de 200 g qui conservent un caractère homogène et représentatif de l'échantillon de départ, on peut utiliser un diviseur d'échantillon à fentes qui permet de séparer de manière aléatoire un échantillon en 2.

L'échantillon prélevé est entièrement versé dans le diviseur de manière à le séparer en deux parties statistiquement équivalentes. Une moitié est mise de côté, l'autre moitié subit à nouveau un fractionnement grâce au répartiteur de

chute. Cette opération est renouvelée aussi souvent que nécessaire, une moitié étant éliminée à chaque étape, l'objectif final étant d'obtenir 2 "sous-échantillons" d'environ 200 g chacun.

6. Mode opératoire

- Peser le tamis vide (P_{TV}).
- Peser le bac de récupération vide (P_{BV}).
- Tarer l'ensemble tamis + bac de récupération et y déposer environ 200g
- de copeaux pesés à 0,1 g près. Soit P_{COP} le poids des copeaux à tamiser.
- Placer l'ensemble sur le plateau vibrant et fermer le couvercle au moyen des boucles de serrage.
- Mettre l'appareil en route et laisser vibrer pendant 15 minutes.
- Peser le tamis contenant les particules restantes qui ne sont pas passées à travers les mailles de 2mm (P_{TP}).
- Peser le bac de récupération contenant les particules ayant traversé le tamis (P_{BP})

Un deuxième essai est réalisé dans ces conditions sur le deuxième sous-échantillon de copeaux issu du même échantillon de départ.

Remarque : les pesées du bac de récupération avant et après tamisage (P_{BV} et P_{BP}) servent à vérifier qu'il n'y a pas eu de perte d'échantillon durant l'opération.

On doit avoir : $P_{TV} + P_{BV} + P_{COP} = P_{TP} + P_{BP}$

7. Calcul

Le pourcentage (en poids) de particules retenues par le tamis dont les mailles sont de 2mm est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ de particules retenues} = \frac{(P_{TP} - P_{TV}) \times 100}{P_{COP}}$$

Ce calcul est effectué pour chacun des 2 sous-échantillons issus de l'échantillon de départ, le pourcentage de particules retenues correspond à la moyenne des 2 résultats.

8. Bibliographie

Résolution oeno 3/2005 : MORCEAUX DE BOIS DE CHENE

EN 1482-1- Engrais et amendements minéraux basiques- Echantillonage et préparation de l'échantillon- Partie 1 : échantillonage.

BOIS DES RECIPIENTS DESTINES A RECEVOIR DU VIN (Oeno 4/2005)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Bois des récipients utilisés lors de l'élaboration de la conservation ou du transport des vins.
Les pièces de bois doivent provenir exclusivement des essences reconnues aptes à conserver le vin (chêne, châtaigner)
Ils sont soit laissés à l'état naturel, soit chauffés de manière qualifiée de légère, moyenne ou forte mais ils ne doivent pas avoir subi de combustion y compris en surface, ne pas être charbonneux, friables au toucher.
Ils ne doivent pas être additionnés d'un quelconque produit destiné à augmenter leur pouvoir aromatisant naturel ou leurs composés phénoliques extractibles.
Ils ne doivent pas avoir subi de traitements chimique, enzymatique ou physique autres que le chauffage lorsqu'il s'agit de récipients neufs.
S'ils ont subi des traitements chimiques, ou physiques, notamment pour le nettoyage des récipients ayant déjà été utilisés, il convient de s 'assurer de l'innocuité parfaite de tels traitements pour des matériaux au contact des aliments, en particulier qu'un rinçage suffisant a permis d'éliminer toute trace de certains produits qui ne sont pas autorisés dans le vin.

2. MARQUAGE ET/OU DOCUMENT D'ACCOMPAGNEMENT DU RECIPIENT

Le marquage ou le document d'accompagnement du récipient doit mentionner l'origine de la ou des espèces botaniques de bois, l'intensité du chauffage éventuel et les consignes de sécurité.

3. PURETE

Les récipients de bois ne doivent pas libérer de substances dans des concentrations qui pourraient induire d'éventuels risques pour la santé.

4. CONSERVATION

Les récipients de bois doivent être lavés avant leur premier usage puis conservés dans des conditions propres à éviter tout développement de micro-organismes indésirables lorsqu'ils sont vides.

LEVURES SÉLECTIONNÉES *SACCHAROMYCES* SPP.
(OIV-Oeno 576A-2017)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les levures sélectionnées *Saccharomyces* spp. peuvent être utilisées pour l'ensemencement, des raisins, des moûts et des vins conformément à la résolution OENO-MICRO 14-546 afin de déclencher et/ou de garantir l'achèvement de la fermentation alcoolique, et la production des vins spéciaux.

Les levures utilisées doivent avoir été isolées des raisins, des moûts ou des vins, ou être le résultat de l'hybridation de souches issues des raisins, des moûts ou des vins, ou être dérivées d'autres levures œnologiques. L'utilisation de levures œnologiques génétiquement modifiées doit être soumise à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

2. ÉTIQUETAGE

Les informations suivantes doivent être indiquées sur l'emballage :

- le nom du genre (*Saccharomyces*), de ou des espèces, de ou des souches, ainsi que tout élément susceptible de garantir la traçabilité du produit,
-la forme physique du produit telle que décrite au point 3,
-le nom du sélectionneur
- le nom et l'adresse du fabricant ou du metteur en marché ou du distributeur
- le mode d'emploi recommandé par le fabricant,
- le taux d'ensemencement recommandé,
- le nombre minimum de cellules revivifiables par gramme de produit (UFC, conformément au point 4.6) garanti par le fabricant, à une température de conservation recommandée,
- le numéro de lot de fabrication, la date d'expiration et les conditions de conservation,
- le cas échéant, l'indication que la ou les souches de levures ont été obtenues par modifications génétiques ainsi que le ou les caractères modifiés,
- tous les additifs présents.

3. CARACTERISTIQUES

La formulation correspond à une culture pure, ou à une culture mixte de souches de levures* Saccharomyces*, ou à une culture mixte de souches de levures* Saccharomyces *et non-* Saccharomyces*.

Les levures sélectionnées* Saccharomyces *peuvent être utilisées sous les formes suivantes :

- *levures sèches actives (LSA) contenant au minimum 92 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,*

- levures surgelées actives (AFY) contenant entre 40 et 85 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,

- levures compressées (COY) contenant entre 30 et 35 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,

- *crèmes de levures (CRY) contenant entre 18 et 25 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,*

- levures incluses (billes) ou immobilisées (ENY) avec de l'alginate et/ou d'autres produits admis par l'OIV, contenant un minimum de 86 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^9 UFC/g de matière sèche,

- Levain de tirage pour les vins mousseux contenant plus de 50×10^6 cellules revivifiables par mL.

4. LIMITES ET MÉTHODES D'ANALYSE

4.1. Humidité

Mesurer l'humidité par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant. La teneur doit être conforme aux caractères d'humidité ou de teneur en eau décrits au point 3.

4.2. Plomb
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.3. Mercure
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.4. Arsenic
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 3 mg/kg de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.5. Cadmium
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.6. Levures revivifiables totales
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur doit être conforme aux caractères décrits au point 3.

4.7. Levures différentes de celles indiquées sur l'étiquetage
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international* afin d'obtenir des colonies en vue de leur identification postérieure.

4.7a. Recherche d'un contaminant au niveau du genre : Une population contaminante d'un genre différent de *Saccharomyces* devrait être 5 logs inférieure à la population totale des souches indiquées sur l'étiquetage, telles que définies dans les caractères au point 3. Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du Codex œnologique international pour faire la différence entre Saccharomyces et non-Saccharomyces.

4.7b. Recherche d'un contaminant au niveau de l'espèce ou de la souche : Les espèces et souches indiquées sur l'emballage doivent compter pour au moins 95 % de la population de levures totale. Procéder au contrôle selon l'Annexe 1.

4.8. Moisissures
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 10^3 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.9. Bactéries lactiques
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 10^5 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.10. Bactéries acétiques
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 10^4 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.11. Salmonelles
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.12. *Escherichia coli*
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international* en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour *Escherichia coli*.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.13. Staphylocoques
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La présence de staphylocoques est évaluée par une culture d'enrichissement sur milieu liquide Giolitti-Cantoni suivie d'une confirmation sur milieu solide Baird-Parker.

Dans les cas où des réponses positives sont obtenues sur milieu Giolitti-Cantoni, la présence de staphylocoques est confirmée par un isolement sur milieu solide Baird-Parker. Une anse de milieu de culture positif est utilisée pour ensemencer les milieux BP afin d'obtenir des colonies isolées.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.14. Coliformes
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international* en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour les coliformes, gélose au désoxycholate.

La teneur doit être inférieure à 10^2 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Les produits doivent être conservés et propagés dans des conditions favorisant leur stabilité génétique.

Se référer systématiquement aux recommandations du fabricant.

7. DOCUMENTATION ACCOMPAGNANT LE PRODUIT

La documentation accompagnant le produit doit indiquer des directives en matière de conservation, transport, manipulation et conditions d'utilisation (température, activation, réhydratation le cas échéant, éventuellement dans des suspensions appropriées de moût ou de vin, etc.).

ANNEXE 1

1. Obtention des colonies

Prélever un échantillon de 1 g, ou de 1 mL dans le cas du levain de tirage, et le mettre en suspension sous conditions stériles dans 100 mL de solution stérile de saccharose à 5 %. Homogénéiser et laisser reposer à 25-30 °C pendant 20 min.
Après réalisation des dilutions décimales adéquates, répandre 0,1 mL de l'échantillon dilué sur la surface d'une plaque de gélose nutritive YEPD (20 g de glucose, 20 g de peptone, 10 g d'extrait de levure, 100 mg de choramphénicol pour éviter la croissance des bactéries et 150 mg de biphényl pour éviter la croissance des moisissures, 20 g d'agar-agar, eau q.s.p. 1000 mL). Laisser incuber six jours à 25 °en aérobiose. Toutes les levures peuvent se développer, y compris les levures non-*Saccharomyces* susceptibles de contaminer ou de faire partie du mélange de levures *Saccharomyces* spp. présentes dans la préparation.

2. Identification d'espèces/souches contaminantes

L'identification est réalisée à partir de colonies isolées sur des plaques.
Comme cela est indiqué dans les caractéristiques, la population contaminante (qui ne correspond ni à la souche pure, ni aux différentes souches en cas de mélange de souches) doit être inférieure à 5% de la population totale. Suite aux dilutions requises pour l'obtention des colonies individuelles, si l'on identifie 20 colonies sur 300, un contaminant à 5% représente (idéalement) 1 colonie sur 20.
On identifie le contaminant au niveau de l'espèce par séquençage D1/D2 (voir 2.1).
Si toutes les colonies sont d'une même espèce, on peut vérifier qu'une souche contaminante est inférieure à 5% par analyse de 20 colonies, par SSR ou PCR delta pour l'espèce *S. cerevisiae* (voir 2.2)

Si la préparation correspond à un mélange de deux ou trois espèces/souches, les moins représentées comptent pour 15% du total. Le contrôle de la composition du mélange par l'identification des colonies ne s'avère pas approprié. En effet, pour un mélange contenant deux souches, la moins représentée devrait produire 3 colonies sur 20 identifiées, recueillies parmi 400 présentes sur la plaque.
Il peut donc être suggéré que le contrôle effectué pour deux **espèces** ou plus en mélange **(proportion des différentes espèces)** soit réalisé par PCR quantitative spécifique, avec des sondes ciblant chacune des **espèces** escomptées. Dans ce cas, aucune culture préalable sur plaque n'est nécessaire. L'ADN est extrait directement à partir de l'échantillon.
Pour le contrôle de **mélanges de souches de la même espèce (proportion des différentes souches)**, la seule possibilité existant jusqu'à présent ne peut exclure la culture sur plaque et l'identification des colonies à l'échelle des souches ; les résultats doivent être interprétés avec précaution, la représentation de chacune des souches présente sur les plaques étant affectée,

d'une part par leurs capacités de croissance, et d'autre part par le fait que le nombre de colonies pouvant raisonnablement être identifiées s'avère trop faible.

2.1. Identification des espèces

L'espèce est identifiée par séquençage de l'ADN du domaine variable D1/D2 de la région ribosomale 26S obtenu par amplification PCR. Il s'agit là de la « méthode de choix » pour l'identification des espèces de levures : les souches qui ont plus de 1% de différence de séquence dans le domaine D1/D2 de 600 nucléotides ne sont pas de la même espèce.

1. Mettre séparément les colonies en suspension, soit directement dans le mélange PCR, soit préalablement dans de l'eau (environ 50 µL en fonction de la taille de la colonie) avant d'additionner un échantillon au mélange PCR ;
2. mélange PCR (volume final : 50 µL) : 10 mM de Tris HCl à pH 8, 50 mM de KCl, 0,1 % v/v de Triton X100, 0,2 mg/mL d'ASB, 3,12 % v/v de glycérol, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTP, 0,1 U/µL de Taq polymérase ;
3. amorces : NL1/NL4. NL 1 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG) et NL 4 (5'-GGTCCGTGTTTCAA GACGG) ;
4. l'amplification est réalisée après 10 min à 95 °C afin de rendre l'ADN accessible, par l'intermédiaire de 30 cycles comprenant les étapes : 95 °C pendant 1 min, 55 °C pendant 45 s, 72 °C pendant 1 min, puis une étape finale à 72 °C pendant 7 min ;
5. le produit PCR est purifié à l'aide d'un « kit de purification PCR » et séquencé à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification ;
6. les séquences obtenues sont comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank (www.ncbi.nih.gov./Genbank).

2.2. Identification des souches

Lorsque l'espèce a été identifiée il est possible d'identifier les souches. Pour la plupart des espèces de levures œnologiques, tout au moins pour les principales utilisées comme levains, la méthode d'identification la plus fiable et la plus précise se base sur l'analyse des séquences (microsatellites) répétées SSR. Les souches diffèrent par le nombre de répétitions de séquences courtes au niveau de certains points de leurs génomes. Ces loci sont délimités par des régions conservées qui sont choisies comme amorces pour l'amplification PCR. L'analyse consiste en une amplification PCR de plusieurs loci, en utilisant des amorces adaptées à chaque espèce de levures, et en une mesure de leur longueur, par électrophorèse capillaire de résolution séquençage, (permettant d'avoir une résolution à la base près)

Remarque :

1. au moment de la rédaction de ce document, il n'est pas possible de procéder au typage des souches pour toutes les espèces de levures ;
2. afin de suivre l'avancée des connaissances, le choix des amorces adaptées pour chacune des espèces est fait en se référant aux travaux publiés dans les journaux scientifiques à comité de lecture international ;

3. pour certaines espèces, jusqu'à environ 9 ou 12 loci sont analysés ; certains loci sont plus discriminants que d'autres ;
4. l'analyse peut être simplifiée en considérant tout d'abord un nombre de loci plus réduit, choisis pour leur plus grand pouvoir discriminatoire, puis en poursuivant l'analyse en cas d'ambigüité ;
5. l'amplification peut être réalisé en multiplex (jusqu'à neuf paires d'amorces) pour certaines espèces telles que *S. cerevisiae*, ce qui permet d'accélérer et de simplifier l'analyse.

Pour *Saccharomyces cerevisiae*, le profil obtenu par « PCR inter-delta » (se référer à la résolution OIV-OENO 408-2011) peut être utilisé. En cas d'ambiguïté cependant, lorsque les profils semblent différents mais sont encore très proches, le typage par SSR est requis.

LEVURES SÉLECTIONNÉES NON-*SACCHAROMYCES* SPP.
(OIV-Oeno 576B-2017)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les levures non-*Saccharomyces* peuvent être utilisées pour l'ensemencement des raisins, des moûts et des vins conformément à la résolution OENO-MICRO 14-456. Une addition de levures non-*Saccharomyces* étant susceptible de ne pas conduire à un achèvement de la fermentation alcoolique, l'ensemencement par des levures non-*Saccharomyces* peut donc être suivi ou être effectué simultanément avec l'inoculation par des levures *Saccharomyces*.
Les levures possédant les propriétés œnologiques souhaitables doivent avoir été isolées des raisins, des moûts ou des vins, ou être le résultat d'hybridations de souches issues des raisins, des moûts ou des vins, ou être dérivées d'autres levures œnologiques.
L'utilisation de levures œnologiques génétiquement modifiées doit être soumise à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

2. ÉTIQUETAGE

Les informations suivantes doivent être indiquées sur l'emballage :
- le nom du genre, de ou des espèces, de ou des souches, ainsi que tout élément susceptible de garantir la traçabilité du produit,
- la forme physique du produit telle que décrite au point 3,
- le nom du sélectionneur,
- le nom et l'adresse du fabricant ou du metteur en marché ou du distributeur,
- le mode d'emploi recommandé par le fabricant,
- le taux d'ensemencement recommandé,
- le nombre minimum de cellules revivifiables par gramme de produit (UFC conformément au point 4.6) garanti par le fabricant, à une température de conservation recommandée,
- le numéro de lot de fabrication, la date d'expiration et les conditions de conservation,
- le cas échéant, l'indication que la ou les souches de levures ont été obtenues par modifications génétiques ainsi que le ou les caractères modifiés,
- tous les additifs présents.

3. CARACTERISTIQUES

La formulation correspond à une culture pure, ou à une culture mixte de souches de levures non-*Saccharomyces*, ou à une culture

mixte de souches de levures* Saccharomyces *et non-*Saccharomyces*.
Les levures sélectionnées non-*Saccharomyces *peuvent être utilisées sous les formes suivantes :

- *levures sèches actives (ADY) contenant au minimum 92 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,*
- *levures surgelées actives (AFY)contenant entre 40 et 85 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,*

- *levures compressées (COY)contenant entre 30 et 35 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,*

- *crèmes de levures (CRY) contenant entre 18 et 25 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^{10} UFC/g de matière sèche,*

- levures incluses (billes) ou immobilisées (ENY) avec de l'alginate et/ou d'autres produits admis par l'OIV, contenant un minimum de 86 % de matière sèche et une teneur en levures revivifiables supérieure ou égale à 10^9 UFC/g de matière sèche.

4. LIMITES ET MÉTHODES D'ANALYSE

4.1. Humidité
Mesurer l'humidité par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant.
La teneur doit être conforme aux caractères d'humidité ou de teneur en eau décrits au point 3.

4.2. Plomb
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.3. Mercure
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.4. Arsenic
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 3 mg/kg de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.5. Cadmium
Procéder au dosage selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 1 mg/kg de matière sèche de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.6. Levures revivifiables totales
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La teneur doit être conforme aux caractères décrits au point 3.

4.7. Levures de genre/d'espèce/de souche différentes du genre/ espèce/souche indiqués sur l'étiquetage
Les genres, espèces et souches indiqués sur l'emballage doivent compter pour au moins 95 % de la population de levures totale. Se référer à l'Annexe 1.

4.8. Moisissures
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 10^3 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.9. Bactéries lactiques
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 10^5 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.10. Bactéries acétiques
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
La teneur doit être inférieure à 10^4 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

4.11. Salmonelles
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.12. *Escherichia coli*
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international* en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour *Escherichia coli.*
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.13. Staphylocoques
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international*. La présence de staphylocoques est évaluée par une culture d'enrichissement sur milieu liquide Giolitti-Cantoni suivie d'une confirmation sur milieu solide Baird-Parker.

Dans les cas où des réponses positives sont obtenues sur milieu Giolitti-Cantoni, la présence de staphylocoques est confirmée par un isolement sur milieu solide Baird-Parker. Une anse de milieu de culture positif est utilisée pour ensemencer les milieux BP afin d'obtenir des colonies isolées.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.14. Coliformes
Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au chapitre II du *Codex œnologique international* en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour les coliformes, gélose au désoxycholate.

La teneur doit être inférieure à 10^2 UFC/g de la préparation correspondante décrite au point 3.

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Les produits doivent être conservés et propagés dans des conditions favorisant leur stabilité génétique.

Se référer systématiquement aux recommandations du fabricant.

7. DOCUMENTATION ACCOMPAGNANT LE PRODUIT

La documentation accompagnant le produit doit indiquer des directives en matière de conservation, transport, manipulation et conditions d'utilisation (température, activation, réhydratation le cas échéant, éventuellement dans des suspensions appropriées de moût ou de vin etc.).

ANNEXE 1

1. Obtention des colonies

Prélever un échantillon de 1 g et le mettre en suspension sous conditions stériles dans 100 mL de solution stérile de saccharose à 5 %. Homogénéiser et laisser reposer à 25-30 °C pendant 20 min.
Après réalisation des dilutions décimales adéquates, répandre 0,1 mL de l'échantillon dilué sur la surface d'une plaque à gélose nutritive YEPD (20 g de glucose, 20 g de peptone, 10 g d'extrait de levure, 100 mg de choramphénicol pour contenir la croissance des bactéries et 150 mg de biphényl pour contenir la croissance des moisissures, 20 g d'agar-agar, eau q.s.p. 1000 mL). Laisser incuber six jours à 25 °en aérobiose. Toutes les levures peuvent se développer, quelles que soient les espèces présentes.

2. Identification de genres/d'espèces/souches contaminantes

L'identification est réalisée à partir de colonies isolées sur des plaques.
Comme cela est indiqué dans les caractéristiques, la population contaminante (qui ne correspond ni à la souche pure, ni aux différentes souches en cas de mélange de souches) doit être inférieure à 5% de la population totale. Suite aux dilutions requises pour l'obtention des colonies individuelles, si l'on identifie 20 colonies sur 300, un contaminant à 5% représente (idéalement) 1 colonie sur 20.
On identifie le contaminant au niveau de l'espèce, donc du genre, par séquençage D1/D2 (voir 2.1). Si toutes les colonies sont d'une même espèce, on peut vérifier qu'une souche contaminante est inférieure à 5% par analyse de 20 colonies, par SSR (voir 2.2).

Si la préparation correspond à un mélange de deux ou trois espèces/souches, les moins représentées comptent pour 15 % du total. Le contrôle de la composition du mélange par l'intermédiaire d'une identification des colonies ne s'avère pas approprié. En effet, pour un mélange contenant deux souches, la moins représentée devrait produire 3 colonies sur 20 identifiées, recueillies parmi 400 présentes sur la plaque.
Il peut donc être suggéré que le contrôle effectué pour deux **espèces** ou plus en mélange **(proportion des différentes espèces)** soit réalisé par PCR quantitative spécifique, avec des sondes ciblant chacune des **espèces** escomptées. Dans ce cas, aucune culture préalable sur plaque n'est nécessaire. L'ADN est extrait directement à partir de l'échantillon.
Pour le contrôle de **mélanges de souches de la même espèce (proportion des différentes souches)**, la seule possibilité existant jusqu'à présent ne peut exclure la culture sur plaque et l'identification des colonies à l'échelle des souches ; les résultats doivent être interprétés avec précaution, la représentation de chacune des souches présentes sur les plaques étant affectée d'une part par leurs capacités de croissance, et d'autre part par le fait que le nombre de colonies pouvant raisonnablement être identifiées s'avère trop faible.

2.1. Identification des espèces

L'espèce est identifiée par séquençage de l'ADN du domaine variable D1/D2 de la région ribosomale 26S obtenu par amplification PCR. Il s'agit là de la « méthode de choix » pour l'identification des espèces de levures : les souches qui ont plus de 1% de différence de séquence dans le domaine D1/D2 de 600 nucléotides ne sont pas de la même espèce.

1. Mettre séparément les colonies en suspension, soit directement dans le mélange PCR, soit préalablement dans de l'eau (environ 50 µL en fonction de la taille de la colonie) avant d'additionner un échantillon au mélange PCR ;
2. mélange PCR (volume final : 50 µL) : 10 mM de Tris HCl à pH 8, 50 mM de KCl, 0,1 % v/v de Triton X100, 0,2 mg/mL d'ASB, 3,12 % v/v de glycérol, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTP, 0,1 U/µL de Taq polymérase ;
3. amorces : NL1/NL4. NL 1 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG) et NL 4 (5'-GGTCCGTGTTTCAA GACGG) ;
4. l'amplification est réalisée après 10 min à 95 °C afin de rendre l'ADN accessible, par l'intermédiaire de 30 cycles comprenant les étapes : 95 °C pendant 1 min, 55 °C pendant 45 s, 72 °C pendant 1 min, puis une étape finale à 72 °C pendant 7 min ;
5. le produit PCR est purifié à l'aide d'un « kit de purification PCR » et séquencé à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification ;
6. les séquences obtenues sont comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank (www.ncbi.nih.gov./Genbank).

2.2. Identification d'une souche

Lorsque l'espèce a été identifiée, il est possible d'identifier les souches. Pour la plupart des espèces de levures œnologiques, tout au moins pour les principales utilisées comme levains, la méthode d'identification la plus fiable et la plus précise se base sur l'analyse des séquences (microsatellites) répétées SSR. Les souches diffèrent par le nombre de répétitions de séquences courtes au niveau de certains points de leurs génomes. Ces loci sont délimités par des régions conservées qui sont choisies comme amorces pour l'amplification PCR. L'analyse consiste en une amplification PCR de plusieurs loci, en utilisant des amorces adaptées à chaque espèce de levures, et en une mesure de leur longueur par électrophorèse capillaire de résolution séquençage, (permettant d'avoir une résolution à la base près).

Remarque :

1. au moment de la rédaction de ce document, il n'est pas possible de procéder au typage des souches pour toutes les espèces de levures ;
2. afin de suivre l'avancée des connaissances, le choix des amorces adaptées pour chacune des espèces est fait en se référant aux travaux publiés dans les journaux scientifiques à comité de lecture international ;
3. pour certaines espèces, jusqu'à environ 9 ou 12 loci sont analysés ; certains loci sont plus discriminants que d'autres ;

4. l'analyse peut être simplifiée en considérant tout d'abord un nombre de loci plus réduit, choisis pour leur plus grand pouvoir discriminatoire, puis en poursuivant l'analyse en cas d'ambigüité ;
5. l'amplification peut être réalisée en multiplex, ce qui permet d'accélérer et de simplifier l'analyse.

MANNOPROTEINES DE LEVURES

OENO 26/2004
OIV-OENO 674-2022
OIV-OENO 740-2024

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les mannoprotéines sont extraites de parois cellulaires de levures *Saccharomyces spp.* ou *non-Saccharomyces* 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 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.

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

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

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.

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**
- **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 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

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 1

Dosage du mannose par méthode enzymatique

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

M-6-P ⟶ (PMI) F-6-P

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

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.

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.

Dosage

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

	Témoin	Dosage
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

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

Expression des résultats

On obtient

Pour le mannose : Cg/l = 0,423x ΔA_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 = 0,430x ΔA_M

Mesure à 365 nm

Pour le mannose : Cg/l = 0,783x ΔA_M

Annexe 2 Détermination du pourcentage de matière sèche insoluble

1.Principe

L'analyse consiste à comparer la matière sèche totale (MS) de la préparation de mannoprotéines de levures avec la matière sèche restante après lavage à chaud (MS insoluble).

2.Matériel et réactifs

Centrifugeuse de 4 200 tr/min (6 000g) et accessoires
Balance ayant une précision de 0,1 mg
Étuve à 105 °C 1 °C

3. Mode opératoire

Obtention de la partie insoluble de la préparation de mannoprotéines de levures.
Dans un pot de centrifugeuse taré,

- placer environ 10 g de la préparation de mannoprotéines de levures précedemment placé dans l'étuve à 105 °C jusqu'à poids constant. Relever le poids exact, soit : M1.
- Mettre en suspension dans de l'eau chaude (70-80 °C).
- Homogénéiser.
- Centrifuger 10 min à 4 200 tr/min (6 000g).
- Jeter le surnageant, mélanger à nouveau dans de l'eau chaude et centrifuger 10 mn à 4 200 tr/min.
- Effectuer l'opération une troisième fois.
- Placer le pot de centrifugeuse taré contenant le culot dans une étuve à 105 °C jusqu'à poids constant et peser. Relever le poids : soit M2 le poids du résidu de la préparation de mannoprotéines de levures constituant la MS insoluble.

4. **Calculs**

Pourcentage de matière sèche insoluble : % MS insoluble = (M2/M1) x 100.

EXTRAITS PROTEIQUES DE LEVURES (EPL)

OIV-OENO 452-2012
OIV-OENO 740-2024

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les protéines des extraits protéiques de levures proviennent majoritairement du cytoplasme des levures *Saccharomyces spp*. ou *non-Saccharomyces* Elles sont séparées par des méthodes physiques après un procédé d'extraction qui limite leur hydrolyse.
Les protéines des extraits protéiques de levures présentent des masses moléculaires et des charges électriques variables en fonction de leur mode d'obtention. Elles sont capables de floculer dans les moûts et les vins pour permettre leur clarification et leur stabilisation colloïdale (opérations de collage).

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

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit indiquer

- le domaine d'application (collage des moûts et des vins)
- Les conditions de sécurité et de conservation ainsi que la date limite d'utilisation.
- Les additifs éventuels
- nº du lot de fabrication

L'indication si les extraits protéiques proviennent de levures obtenues par modification génétiques ainsi que le caractère modifié si c'est le cas

3. CARACTERISATION

3.1 - Les EPL se présentent sous une forme de poudre, généralement micro-granulée, de couleur jaune claire à beige ou beige, avec une légère odeur de levure.

3.2 - Les EPL sont solubles dans l'eau et insolubles dans l'éthanol.
En solution aqueuse, elles précipitent quand on rajoute 1 volume d'éthanol.

3.3 - Dosages des protéines

3.3.1 Protéines totales

Le dosage des protéines peut se faire par la méthode de Lowry décrite dans l'annexe 1

La teneur en protéines totales des EPL doit être supérieure à 50% du produit sec

3.3.2 taille des protéines

L'évaluation de la taille ou des poids moléculaires des protéines est réalisée par la technique de séparation par électrophorèse SDS-PAGE décrite en annexe 3

Exemple de différents profils d'extraits protéiques de levures avec coloration au bleu de Coomasie :



1: Marqueur de taille
2: Souche 1 Phase Exponentielle
3: Souche 1 Phase Stationnaire
4: Souche 2 Phase Exponentielle
5: Souche 2 Phase Stationnaire
6: Souche 3 Phase Exponentielle (Souche dépourvue de protéase A)
7: Souche 3 Phase Stationnaire (Souche dépourvue de protéase A)

3.3.3 taux de protéines supérieur à 15 KDa

Ce taux est estimé au moyen de la technique de perméation sur gel décrite en annexe 4

Au moins 50% des protéines totales doivent avoir des poids moléculaires supérieurs à 15 KDa

3.4. Azote aminé

La teneur en azote aminé exprimée en glycine représente 10 à 20% maximum du produit sec

- Le dosage de l'azote aminé pourra être fait par la Méthode du Dinitrofluorobenzène (DNFB) décrite en annexe 2

4. ESSAIS

4.1 Perte à la dessiccation

Mettre 5 g d'EPL 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.

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 d'EPL à 10 g/l dans l'eau.

4.4 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 2 mg/kg.

4.5 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 1 mg/kg.

4.6 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 3 mg/kg.

4.7 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 1 mg/kg.

4.8 ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

4.8.1 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.

4.8.2 Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.
Il faut moins de 10 UFC/g de préparation.

4.8.3 Staphylococcus

Procéder au dénombrement selon une méthode à décrire au Chapitre II du Codex Œnologique international.
Absence contrôlée de Staphylococcus aureus sur un échantillon de 1 g.

4.8.4 Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.
Absence contrôlée de salmonelles sur un échantillon de 25 g.

4.8.5 *Escherichia coli*

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.
Absence contrôlée d'Escherichia coli sur un échantillon de 25 g.

4.8.6 Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.
Il faut moins de 10^3 UFC/g de préparation

4.8.7 Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.
Il faut moins de 50 UFC/g de préparation

4.8.8 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

4.9 TEST D'EFFICACITE DES EPL POUR LE COLLAGE DES MOUTS ET DES VINS

4.9.1 Principe

Il s'agit de déterminer la dose la plus compatible pour obtenir une clarification rapide et une stabilité colloïdale du vin.

4.9.2 Produit :

Moûts ou vins à coller

4.9.3 Protocole :

4.9.3.1 Solution de EPL à 2%
Dissoudre 2 g de EPL dans 100 ml d'eau distillée.

4.9.4 Test de collage

Placer 100 ml de moût ou de vin dans autant de tubes de 100 ml que de dosages retenus. En pratique, la comparaison de 4 doses est suffisante. Soit 5 tubes de 100 ml dont le témoin.
Ajouter 0 (témoin), 1, 5 ml, 2ml, 2,5 ml de la solution de EPL(4.9.3.1) pour un vin rouge et 0,5ml, 1ml, 1,5 ml de la solution de EPL pour un moût blanc ou rosé ou un vin blanc ou rosé. Ces quantités correspondent respectivement à des doses finales de 0, 200 mg/l, 300mg/l, 400 mg/l, 500mg/l pour un vin rouge et de 0, 100 mg/l, 200 mg/l, 300mg/l pour un moût blanc ou rosé ou un vin blanc ou rosé

- Homogénéiser chaque tube juste après introduction de la solution d'EPL (2-3 retournements manuels des tubes protégés par un film. Observer, la vitesse d'augmentation de turbidité, d'apparition des flocons toutes les 10 mn pendant 30 mn puis après 8 heures comparer entre chaque essai et contrôler :

- la turbidité,
- le volume de lies,
- les intensités colorantes,
- la qualité organoleptique
- la stabilité colloïdale par un passage à 80°C pendant 20mn dans un bain-d'eau ou une étuve à 100 °C et un refroidissement rapide sous un courant d'eau froide.

5. CONSERVATION

Les Extraits protéiques de levures ont une durée de conservation de 3 ans en emballage non ouvert, stockés dans des locaux tempérés à l'abri de l'humidité..

6. BIBLIOGRAPHIE

Feuillat M. (1986). Autolysats de levures à usage oenologique et leur procédé de fabrication. France.

Feuillat M. (1987). "Préparation d'autolysats de levures et addition dans les vins effervescents élaborés selon la méthode champenoise." Rev. Fr. Oeno **109**: 17-27.

Charpentier C. and Feuillat M. (1992). Yeast autolysis. Wine microbiology and biotechnology.F. G.H. Chur, Harwood Academic Publisher.

Charpentier C. and Freyssinet M. (1989). "The mechanism of yeast autolysis in wine." Yeast: S1 S48.

Charpentier C. (2000). "Yeast autolysis and yeast macromolecules? Their contribution to wine flavor and stability." Am. J. Enol.Vitic. **51**: 271-277.

Charpentier C., Caillet M.M, Feuillat M. (2006) Essais de collage de moûts blancs et de vins rouges avec un extrait protéique levurien : comparaison avec les colles traditionnelles. Rev. Œnologues 120, ,juillet 2006.

Annexe 1

1. Méthode Lowry

2. Introduction

La méthode proposée est celle de LOWRY (LOWRY et al. 1951) mais elle peut être remplacée par d'autres méthodes par exemple celle de BRADFORD (1976). Bradford, M. M. (1976) *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Anal. Biochem. **72**:248-254.

1. Domaine d'application

La méthode de LOWRY est une méthode dérivée de celle du Biuret : en milieu alcalin, les ions cuivre forment avec les protéines un complexe cuivrique violet-rose caractéristique des liaisons peptidiques Elle est 100 fois plus sensible que celle du Biuret.

2. Définition

La méthode de LOWRY consiste à complexer par le cuivre, en milieu alcalin, environ un quart des acides aminés constituant les protéines. Le réactif de Folin Ciocalteu (réactif phosphomolybdique) réagit avec les acides aminés aromatiques des protéines

L'absorbance du complexe formé est déterminée par spectrophotométrie à 750 nm. Le principal inconvénient de cette méthode est l'interférence du réactif de Folin avec d'autres composés (EDTA, dithioérythritol, glutathion oxydé...)
Le dosage des protéines hydrosolubles se fait par comparaison avec une courbe-étalon établie à partir de solutions de protéines de concentration connue. (type BSA)

5. Réactifs et produits

- Solution A : solution de Na_2CO3 à 2% dans NaOH 0,1 M contenant du tartrate de sodium (ou de potassium) 0,02% (500 ml).
- Solution B : solution de $CuSO4.5\ H2O$ à 5% (100 ml).
- Réactif C : à réaliser extemporanément. 50 ml de solution A + 1 ml de solution B.
- Réactif de FOLIN-CIOCALTEU : solution commerciale.
- Solution de sérum albumine bovine standard (BSA)

6. Appareillage

- Tubes à essais
- Pipettes classe A
- Micropipettes
- film étirable pour obturation
- Spectrophotomètre Visible

7. Mode opératoire

7.1 Gamme-étalon de protéines : préparation et dosage

La gamme-étalon est effectuée à partir d'une solution standard de BSA à 0 5 $mg.ml^{-1}$.

- Dans des fioles jaugées de 100 ml préparer des solutions de BSA contenant 0,100, 200, 300 et 400 $\mu g.ml^{-1}$ de BSA à partir de la solution mère
- Répartir dans des tubes à essais 0,6 ml de chacune des dilutions. Un tube témoin contiendra uniquement 0,6 ml d'eau distillée

Bien homogénéiser par renversement chaque solution.

- Ajouter dans chaque tube :
- 3 ml de réactif C
- Fermer le tube à l'aide du film étirable et homogénéiser par retournement.
- Laisser reposer 10 minutes avant d'ajouter 0,3 ml de réactif de FOLIN.
- Homogénéiser.
- Attendre 30 minutes à l'obscurité puis mesurer l'absorbance à 750 nm en réglant le zéro avec la solution 'eau distillée' (concentration en BSA 0 $\mu g.\ ml^{-1)}$.
- Tracer la courbe D.O. = f(concentration en protéines).

7.2 Dosage des protéines de l'Extrait Protéique de Levures

- Dans 3 tubes à essais ajouter successivement :
- 0,6 ml d'extrait dilué au 1/20^{e} 1/30^{e} et 1/40^{e} (soit 30, 20 et 15 µl dans 0,6 ml)
- 3 ml de réactif C ; homogénéiser après obturation des tubes et laisser reposer 10 minutes
- 0,3 ml de réactif de FOLIN, Homogénéiser.
- Attendre 30 minutes à l'obscurité
- Mesurer l'absorbance. à 750 nm.

8. Calculs

- Remarque : si les valeurs de l'absorbance sont faibles, recommencer en effectuant des dilutions moins importantes de **l'extrait protéique de levures** (1/10^{e} 1/5^{e} 1/4 soit 60, 120 et 150 µl dans 0,6ml).
- Déterminer par rapport à la courbe-étalon la concentration en protéines de l'EPL en µg.ml^{-1} puis en mg.ml^{-1}.par lecture directe ou en utilisant la droite de régression de la courbe-étalon (préciser sur la courbe-étalon l'équation de cette droite et le coefficient de corrélation).

Annexe 2

1. Méthode au Dinitrofluorobenzène

2. Introduction

Cette méthode permet de doser rapidement l'azote aminé dans une solution biologique par rapport à une gamme étalonréalisée avec une solution de glycine.

3. Domaine d'application

Produits œnologiques d'origine végétale ou animale

4. Définition

Le Dinitrofluorobenzène ou DNNFB réagit avec les fonctions NH_2 libres contenues dans les acides aminés pour donner un composé de couleur jaune vif dosé par colorimétrie à 420 nm. La réaction s'effectue à un pH > 9,3.

5. Réactifs et produits

Réactifs :

- Borax ou Tétraborate de sodium
- Dinitrofluorobenzène Acide chlorhydrique 10 M
- Glycine

6. Appareillage

- tubes à hémolyse
- micropipettes
- Spectrophotomètre visible
- Bain d'eau à 60 °C

7. Echantillonnage

- Préparer une solution de trétraborate de sodium à 5% dans de l'eau pure
- Préparer une solution au DNFB : introduire 130 µl de DNFB dans 10 ml d'éthanol pur à 95 % vol.
- Préparer une solution d'acide chlorhydrique 2M
- Réaliser une gamme étalon à partir d'une solution mère de glycine à 2 g/l (M=75,07 g) par ex 0 , 50 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l
- Préparer une solution à 2 g/l du produit à doser

8. Mode opératoire

- Dans un tube a hémolyse introduire :
  - 380 µl de Borax à 5%
  - 20 µl de l'échantillon à doser
  - 20 µl de solution au DNFB
  - procéder à l'identique pour la gamme de glycine
  - Agiter et placer au bain d'eau à 60 °C pendant 30 min
  - Ajouter 3 ml de HCL 2M
  - Agiter et lire l'absorbance spécifique à 420 nm pour l'échantillon
  - Réaliser une droite étalon avec la gamme de Glycine

9. Résultats

Reporter la valeur de l'absorbance à 420 nm de l'échantillon sur la droite étalon

Les résultats sont exprimés en g/l de Glycine

Annexe 3

Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

1. Introduction

L'électrophorèse SDS-PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) est une variante d'électrophorèse couramment utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire

2. Domaine d'application

Evaluation des poids moléculaires des protéines d'origine végétale ou animale. Cette méthode peut s'appliquer à tous les produits d'origine biologique et aux produits œnologiques contenant des protéines.

3. Principe

La détermination des poids moléculaires des protéines est réalisée par électrophorèse SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli (1970). Cette technique permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire grâce au S-dodecyl sulfate ou SDS, molécule très fortement chargée négativement qui uniformise leurs charges et leur font perdre leur structure tridimensionnelle native. La vitesse de migration de l'ensemble de la molécule dénaturée/SDS dépend uniquement du poids moléculaire des protéines. Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, les ponts disulfures des protéines doivent être réduits par le 2-Mercaptoéthanol.

Le milieu de migration est constitué d'un gel de Poly-Acrylamide.

Le gel est composé de deux parties. Un gel de concentration qui, comme son nom l'indique, permet aux protéines de se concentrer avant leur migration dans le gel de séparation situé en dessous

Le gel de concentration contient 5 % d'acrylamide-bisacrylamide, tandis que le gel de séparation en contient 12 %.

La migration se fait dans du tampon d'électrophorèse réfrigéré à 12°C et sous agitation pendant environ 1 H 30 sous une tension de 80 V pour le gel de concentration, puis pendant près de 3 H à 170 V pour le gel de séparation.

Le gel une fois démoulé subit une coloration pour révéler les bandes de protéines. Les poids moléculaires de ces dernières peuvent être mesurés à l'aide de marqueurs de taille connues ayant migré avec les échantillons. Par exemple à l'aide d'un marqueur commercialisé par Sigma sous le nom

Molecular Weight Standard Mixture avec les tailles suivantes : 15, 25, 35, 50, 75, 100 et 150 Kda.

4. Réactifs et produits

4.1. tampon de dénaturation

- tampon Tris Hcl 0,125 M pH 6,8
- eau distillée
- SDS à 4%
- 2 mercaptoéthanol à 10%;
- bleu de bromophénol à 0,2%
- glycérol pur
- eau distillée QSP

4.2. gel de séparation, préparation pour 30 ml

- 7,50 mL d'acrylamide bis acrylamide
- 11,25 mL de tampon Tris/Hcl à 0,75 M pH 8,8
- 0,30 mL de SDS à 10%
- 10,95 mL d'eau distillée
- 30 microlitres de TEMED pour la polymérisation
- après agitation, ajouter 300 microlitres de persulfate d'ammonium à 20%

2.3. Gel de concentration, préparation pour 10 ml

- 1,25 mL d'acrylamide bis acrylamide
- 1,25 mL de tampon Tris/Hcl à 0,25 M pH 6,8
- 0,10 mL de SDS à 10%
- 7,4 mL d'eau distillée
- pour la polymérisation ajouter 40 microlitres de TEMED
- après agitation, ajouter 100 microlitres de persulfate d'ammonium à 20%

4.4. Tampon de migration, préparation pour 1 litre

- 12,5 mL de Tampon Tris 25mM pH 8,3
- 14,4 g de glycine
- 977,5 mL d'eau distillée
- 10 mL SDS 10%

5. Appareillage

Le matériel d'électrophorèse
- des plaques
- des pinces
- le joint d'étanchéité
- Le peigne
- les espaceurs

6. Echantillonnage

6.1. **Dénaturation des protéines des produits**

- les échantillons sont traités dans du tampon de dénaturation,préparé juste avant l'opération de dénaturation.
- 50 microlitres d'échantillons sont mélangés avec 50 microlitres de tampon dénaturant.
- L'ensemble est ensuite chauffé à ébullition pendant 4 minutes afin de favoriser la dénaturation des protéines.

7. Mode Opératoire

7.1 **Préparation des plaques**

- les plaques d'électrophorèse sont nettoyées avant utilisation avec de l'eau (éventuellement savonneuse) puis avec de l'alcool à 70%.
- essuyer les plaques avec un papier, sans laisser de fibres sur les faces où sera coulé le gel.
- le joint d'étanchéité sur la plaque à bords rond.
- mettre en place des espaceurs et la deuxième plaque en verre.
- L'ensemble est ensuite consolidé à l'aide des pinces.

7.2 **Coulage du gel de séparation**

- Le gel de séparation dés sa préparation, est coulé entre les 2 plaques à l'aide d'une pipette.
- Afin d'éviter la présence de bulle dans le gel, le montage est incliné lors du remplissage.
- Le gel est ensuite recouvert d'eau distillée afin d'obtenir une surface parfaitement horizontale.

7.3 **Coulage du gel de concentration**

- Retirer l'eau distillée du dessus du gel de séparation
- remplir le montage avec le gel de concentration jusqu'au niveau supérieur des plaques de verre en le maintenant incliné.
- Mettre le peigne en place pour former des puits dans le gel de concentration.

7.4 **Dépôts des échantillons**

- Retirer le peigne
- Placer les plaques et les cuves de migration dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir les cuves avec le tampon de migration en commençant par la partie supérieure puis inférieure.
- Déposer 50 microlitres d'échantillon protéique dénaturé dans chaque puit à l'aide d'une seringue et selon la technique sous- marine.
- Déposer également un marqueur de taille chacun des puits se situant vers les bords afin d'encadrer les puits contenant les échantillons.
- une fois les dépôts réalisés, la migration est lancée assez rapidement pour éviter la diffusion des dépôts

7.5 **Lancement et arrêt de l'électrophorèse**

- la durée de l'électrophorèse dépend de plusieurs facteurs : le
- générateur utilisé, l'épaisseur du gel, la quantité de tampon utilisée, sa
- dilution...

- Fermer le couvercle de la cuve
- Vérifier que le générateur est éteint ou hors tension
- Connecter les fils du couvercle au générateur
- maintenir la température à 12°C

- Brancher le générateur au secteur
- Mettre le générateur en marche sur le voltage choisi : 80 volts pendant 1h30 pour le gel de concentration puis 170 volts pendant environ 3h pour la migration dans le gel de séparation
- Arrêt de l'électrophorèse jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bord inférieur des plaques.
- Eteindre le générateur et le déconnecter du courant
- Débrancher les fils du couvercle
- Ouvrir la cuve d'électrophorèse
- Sortir le gel sur son support

8. Résultats

Les bandes perpendiculaires au trajet de migration correspondant à chaque molécule de protéines peuvent être révélées par plusieurs types de coloration. L'intensité et l'épaisseur des bandes dépendent de la concentration en protéine.

Le marqueur de taille permet d'apprécier directement le poids moléculaire des protéines pour chaque bande.

8.1 **Coloration des gels d'électrophorèse**

Plusieurs types de coloration peuvent être appliqués afin de caractériser le plus précisément possible les protéines présentes.

Coloration au bleu de Coomasie

Après migration, les gels d'électrophorèse sont immergés dans une solution de coloration au bleu de Coomasie (0,025 % de Bleu de Coomasie R250, 40 % de Méthanol, 7 % d'acide acétique) pendant une nuit.

Le lendemain les gels d'électrophorèse sont plongés pendant 30 min dans un premier bain de décoloration (40 % de méthanol, 7 % d'acide acétique) pour enlever l'excès de colorant. Puis ils sont déposés dans un second bain (5 % de méthanol, 7 % d'acide acétique) qui est changé régulièrement jusqu'à obtention d'un fond presque incolore. Les étapes de coloration et décoloration sont réalisées sous agitation à température ambiante.

Les gels sont conservés dans de l'eau distillée avant d'être scannés pour analyses.

Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent permet de détecter des quantités de protéines plus faibles que la coloration au bleu de Coomasie. Les produits utilisés pour cette coloration sont fournis par *Biorad* et font partie du kit *Silver Stain Plus.*

L'électrophorèse une fois terminée, le gel est placé dans un bain de 400 ml de solution de fixation (50 % de méthanol, 10 % d'acide acétique, 10 % de fixative enhancer concentrate (kit), 30 % d'eau distillé) pendant 20 min sous agitation à température ambiante.

Le gel est ensuite rincé deux fois avec 400 ml d'eau distillé pendant 10 min dans le but d'éliminer l'acide acétique néfaste à l'étape de coloration.

La coloration est réalisée avec 100 ml d'une solution préparée comme indiqué ci-dessous :

Dans un grand bécher déposer :

- 35 ml d'eau distillée
- 5 ml de solution « Silver Complexe »
- 5 ml de solution « Reduction Moderator »
- 5 ml de réactif « Image developement »

Une fois ces produits bien mélangés et juste avant utilisation, 50 ml de solution « Developement Accelerator », à température de la pièce, sont additionnés au bécher. La préparation est alors versée sur le gel dans le bac de coloration. Apres une durée de 20 à 60 min, en fonction de l'échantillon et de sa concentration, des bandes brunâtres apparaissent.

La réaction est alors stoppée par une solution d'acide acétique à 5 % pendant au moins 15 min, puis le gel est déposé environ 5 min dans de l'eau ultrapure. Les gels sont alors prêts à être scannés pour déterminer les poids moléculaires des bandes de protéines.

Coloration des glycoprotéines

Cette méthode est réalisée afin d'exprimer la présence de glycoprotéines dans les produits levuriens. Elle est réalisée à l'aide du Kit « GelCode® Glycoprotein Staining » commercialisé par la société Pierce Biotechnology.

Après électrophorèse, le gel est fixé par immersion complète dans un bain de 300 ml de méthanol à 50 % pendant 30 min sous agitation.

Laver le gel dans un bain contenant 300 ml d'acide acétique à 3% pendant 10 min. Renouveler cette étape une fois. (La coloration peut être stoppée après cette étape dans de l'eau distillée toute une nuit).

Le gel est ensuite recouvert de 25 ml de « Oxydizing Solution » sous agitation pendant 15 min.

Le gel est alors lavé 3 fois avec 300 ml d'acide acétique à 3 % pendant 5 min.

Une solution de 25 ml de GelCode® Glycoprotein Staining est déposé sur le gel pendant 15 min sous agitation.

Déposer 25 ml de « Reducing Solution » sous agitation douce pendant 5 min.

Laver le gel abondamment avec une solution d'acide acétique à 3 %. Les glycoprotéines apparaissent sous forme de bandes magenta. Le gel peut être conservé dans une solution d'acide acétique à 3 % avant d'être scanné.

Annexe 4

Chromatographie de perméation de gel

1. Introduction

La méthode proposée est une technique de séparation des molécules . Ce type de chromatographie est aussi appelé tamisage moléculaire ou chromatographie d'exclusion.

2. Domaine d'application

Le profil des polymères sont étudiés dans les produits biologiques par chromatographie de perméation de gel sur une colonne optimisée pour l'analyse des protéines. Une double détection 280nm/214 nm permet de suivre l'élution de molécules contenant des acides aminés avec noyaux aromatiques et les liaisons peptidiques.

3. Définition

La chromatographie de perméation de gel permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme à l'aide d'une colonne contenant des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et éluées les premières au niveau du volume mort (Vm ou V0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tard, leur migration étant freinée par leur inclusion dans le gel. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire.

4. réactifs et produits

- NaH2PO4,2 H2O
- Na2HPO4,2H2O
- NaCl
- NaOH 10 M

composé	Poids moléculaire en kDa
Albumine bovine	66
Albumine d'oeuf	45
Glycéraldehyde 3 phosphate déhydrogenase	36
Carbonic anhydrase bovine	29
Trypsinogene pancreas bovin	24
Trypsine inhibiteur de soja	20
lactalbumine	14.2

5. Appareillage

- Colonne chromatographique de type Colonne Ge Health Care : Superdex 200 (diamètre 10 mm * longueur 300 mm)

- Filtres en ester de cellulose porosité : 0,22 µm
- Coupelle
- Becher de 2 L
- Fiole jaugée 1 L
- Membranes 0,45 µm pour solution aqueuse

6. Mode opératoire

6.1 . Tampon et conditions chromatographiques

Dans une coupelle, peser :
$NaH_2PO_4, 2\ H_2O$ = 1,56 g
$Na_2HPO_4, 2\ H_2O$ = 1,58 g
NaCl = 14,63g
- Transvaser dans un bécher contenant 0,9 litre d'eau ultrapure . Le pH de cette solution doit être d'environ 6,5. Le ramener à pH = 7,2 avec du NaOH 10 M.

- Transvaser dans une fiole jaugée de 1 litre et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau ultrapure . Filtrer sur membrane 0,45 µm pour solution aqueuse.
Le débit est fixé à 0,6 ml/min.

6.2 . Préparation des échantillons

Pour analyser par exemple un produit sous forme poudre, diluer 1 g dans 100 ml d'eau ultrapure filtrer l'échantillon sur un filtre en ester de cellulose de 0,22 µm

6.3 . Etalonnage de la colonne

Pour étalonner la colonne, on trace une courbe du log du poids moléculaire des étalons de poids moléculaires en fonction du temps de rétention.
Injecter la solution de l'échantillon tel que.

7. Résultats

Injecter le mélange des étalons de poids moléculaires comme indiqué au point 7.3. Tracer la courbe du log du poids moléculaire des étalons en fonction du temps de rétention. Déterminer le poids moléculaire des pics du produit à en se référant à cette courbe.

AUTOLYSATS DE LEVURES

OIV-OENO 496-2013
OIV-OENO 740-2024

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les autolysats de levures sont utilisés en tant que nutriments pour la réhydratation des levures sèches actives destinées à la fermentation alcoolique et également en tant que nutriments au cours de la fermentation alcoolique. Ils sont issus de biomasse de levures du genre *Saccharomyces spp* ou *non-Saccharomyces*. Ils sont obtenus à partir d'une biomasse de levures, à la suite d'une autolyse éventuellement combinée à des traitements thermiques et/ou à des modifications de pH. L'autolyse se définie comme l'autodigestion des protéines et d'autres constituants cellulaires par les enzymes contenues dans les cellules de levures.

Les techniques de production du microorganisme sont celles utilisées conventionnellement pour les biomasses de levures. Il n'y a aucun ajout d'antibiotique dans le procédé ni de composés autres que ceux nécessaires à la croissance de la levure. Si les autolysats proviennent de levures génétiquement modifiées, celles-ci doivent avoir été soumises à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

2. ETIQUETAGE

Doivent figurer sur l'étiquette:
- 1 Le nom du genre et de l'espèce de l'autolysat de levure
- 2 La teneur en Azote organique
- 3 La teneur en acides aminés
- 4 Les additifs éventuels
- 5 Le mode d'emploi
- 6 Le numéro du lot ainsi que la date limite d'utilisation et les conditions de conservation dans des

conditions définies de température, d'humidité et d'aération,
- 7 Si nécessaire l'indication que les autolysats ont été obtenus à partir de levures ayant subit une modification génétique ainsi que le caractère modifié si cela est le cas.

3. CARACTÈRES

Elles se présentent sous forme de poudre, flocons ou granules, de couleur jaune claire à brune avec une odeur caractéristique de levure. Ils peuvent être également proposés sous forme liquide de couleur jaune ocre à brune.

Les autolysats de levures sont très solubles dans l'eau. La partie soluble est inférieure à 80 % de la matière sèche. La partie soluble de la matière sèche présente dans l'autolysat sous forme liquide doit également être inférieure à 80 %.

4. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

4.1 – Azote

4.1.1 La teneur en azote total, exprimée en élément N, doit être inférieure à 12% de la matière sèche selon la méthode d'analyse décrite au Chapitre II du Codex Oenologique International.

4.1.2 La teneur en azote ammoniacal, exprimée en élément N, doit être inférieure à 0,5 % de la matière sèche. Elle est déterminée par la méthode suivante.
Placer 1 g de matière sèche dans 100 ml de KCL 0,5 M, agiter pendant 20 à 30 mn, introduire les 100 ml dans l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau décrit au Chapitre II du Codex Œnologique International pour le dosage de l'azote total, 50 ml d'hydroxyde de sodium à 30 % (R), distiller en recueillant 250 ml dans une fiole conique contenant 5 ml d'acide borique à 4 % (R), 10 ml d'eau et 2 à 3 gouttes d'indicateur mixte au rouge de méthyle et bleu de méthylène (R), titrer le distillat par l'acide chlorhydrique 0,1 M jusqu'au virage au violet rose de l'indicateur.
1 ml de solution d'acide chlorhydrique correspond à 1,4 mg d'azote N.
Soit *n* le nombre de ml versé : 100 g d'autolysats de levures contiennent 0,14 n g d'azote ammoniacal exprimé en élément N.

4.1.3 L'azote organique correspond à la différence azote total – azote ammoniacal.

4.1.4 La teneur en acides aminés, en équivalent glycine, doit être comprise entre 10 % et 20 % de la matière sèche, selon la méthode au DNFB décrite en annexe, soit entre 1,9 % et 3,7 % de la matière sèche, exprimée en élément N.

4.2 - Humidité

Mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant (environ 3 heures).
L'humidité maximale pour les formes solides doit être inférieure à 7 %.

Les limites en métaux lourds se rapportent à la matière sèche pour les formes sèches ou la forme liquide.

4.3 - Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique

International.
La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.4 - Mercure
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.5 - Arsenic
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.6 - Cadmium
Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.7 - Levures revivifiables
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
Le nombre doit être inférieur ou égale à 10^2 UFC/g ou ml pour la forme liquide

4.8 - Moisissures
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
Le nombre doit être inférieur à 10^3 UFC/g ou ml pour la forme liquide

4.9 - Bactéries lactiques
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International
Le nombre doit être inférieur à 10^3 UFC/g ou ml pour la forme liquide.

4.10 - Bactéries acétiques
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
Le nombre doit être inférieur à 10^3 UFC/g ou ml pour la forme liquide.

4.11 - Salmonelles
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g ou ml pour la forme liquide.

4.12 - Escherichia coli
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g ou ml pour la forme liquide.

4.13 - Staphylocoques
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g ou ml pour la forme liquide.

4.14 - Coliformes
Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex Œnologique International.
Le nombre doit être inférieur à 10^2 UFC/g ou ml pour la forme liquide.

5. ADDITIFS
Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION
Les autolysats de levure doivent toujours être conservées à l'abri de l'air dans des sachets scellés . Stocker dans un endroit frais et sec.
Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant.

Annexe 1

Méthode au Dinitrofluorobenzène

1. Introduction
Cette méthode permet de doser rapidement l'azote aminé dans une solution biologique par rapport à une gamme étalon réalisée avec une solution de glycine.

2. Domaine d'application
Produits œnologiques d'origine végétale ou animale

3. Définition
Le Dinitrofluorobenzène ou DNFB réagit avec les fonctions NH_2 libres contenues dans les acides aminés pour donner un composé de couleur jaune vif dosé par colorimétrie à 420 nm. La réaction s'effectue à un pH > 9,3.

4. Réactifs et produits
Réactifs :
- Borax ou Tétraborate de sodium,
- Dinitrofluorobenzène,
- Acide chlorhydrique 10 M,
- Glycine.

5. Appareillage
- tubes à hémolyse,
- micropipettes,
- Spectrophotomètre visible,
- Bain d'eau à 60 °C.

6. Echantillonnage

- Préparer une solution de tétraborate de sodium à 5% dans de l'eau pure,
- Préparer une solution au DNFB : introduire 130 µl de DNFB dans 10 ml d'éthanol à 95 % vol,
- Préparer une solution d'acide chlorhydrique 2M,
- Réaliser une gamme étalon à partir d'une solution mère de glycine à 2 g/l (M=75,07 g) par ex 0,50 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l,
- Préparer une suspension à 2 g/l du produit à doser.

7. Mode opératoire

- Dans un tube à hémolyse introduire :
  - 380 µl de Borax à 5%,
  - 20 µl de l'échantillon à doser,

- 20 µl de solution au DNFB,
- procéder à l'identique pour la gamme de glycine,
- Agiter et placer au bain d'eau à 60 °C pendant 30 min,
- Ajouter 3 ml de HCl 2M,
- Agiter et lire l'absorbance spécifique à 420 nm pour l'échantillon,
- Réaliser une droite étalon avec la gamme de glycine.

8. Résultats

Reporter la valeur de l'absorbance à 420 nm de l'échantillon sur la droite étalon.

Les résultats sont exprimés en mg/l de glycine.

ENVELOPPES CELLULAIRES DES LEVURES
(Ecorces de levure)

OENO 4/87
OIV-OENO 497-2013
OIV-OENO 497-2013
OIV-OENO 740-2024

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les enveloppes cellulaires des levures sont obtenues à partir de levures *Saccharomyces spp*. ou *non-Saccharomyces*. 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.

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.

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 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 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 ºC, 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 128ºC 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.

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
- H_2SO_4 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.

- **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 H2SO4 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 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

- 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 :

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 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

Zéolithe Y-faujasite
$(Na_2,Ca,Mg)_{3.5}[Al_7Si_{17}O_{48}]\cdot 32(H_2O)$

CAS nº 1318-02-1

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La zéolithe Y-faujasite est synthétisée à partir de sources d'alumine, telles que l'aluminate de sodium, et de sources de silice, telles que le silicate de sodium.

Les zéolithes Y-faujasite incorporées dans les plaques de filtration en profondeur jouent un rôle important pour la clarification et l'élimination sélective simultanées de certaines molécules de contamination, altérant l'odeur des vins

2. CARACTÉRISTIQUES

Les zéolithe Y-faujasite destinées à l'élimination sélective des molécules de contamination, telles que le trichloroanisole, sont caractérisées par un rapport silice/alumine égal ou supérieur à 3. Les charges négatives de la structure sont compensées par les charges positives des cations situés en dehors de la structure.

3. ESSAIS

3.1 Perte à la dessiccation
Placer 5 g de zéolithe Y-faujasite dans une capsule. Chauffer à l'étuve à 120 ± 2 ºC. Après 2 heures, la perte de poids doit être inférieure à 5 %.

3.2 Odeur et saveur
Placer 2,5 g de zéolithe Y-faujasite dans un litre de vin. Laisser reposer 24 heures. Déguster le vin d'essai (avec par exemple le test duo-trio ou se référer au document sur l'analyse sensorielle de l'OIV) par rapport au même vin n'ayant pas reçu de zéolithe.
L'essai peut être également réalisé en utilisant des plaques de filtration avec zéolithe Y-faujasite préalablement conditionnées conformément aux instructions d'utilisation du fabricant. Déguster le vin filtré par rapport au même vin ayant été filtré au travers de plaques de filtration en profondeur standards sans zéolithe.

La zéolithe Y-faujasite ne doit communiquer ni odeur ni goût étranger au vin.

3.3 pH

Ajouter 1 g de zéolithe Y-faujasite dans 40 ml d'eau distillée et agiter pendant 20 minutes. Après avoir laissé reposer pendant 5 minutes, le pH du surnageant doit être situé entre 5 et 7.

3.4 Teneurs en métaux

3.4.1 Préparation de la solution d'essai

Ajouter lentement de l'acide tartrique à un litre d'eau distillée jusqu'à atteindre un pH de 3. Dans une fiole de 500 ml à large col pouvant être hermétiquement bouchée, ajouter 500 ml de solution d'acide tartrique. Peser 10 g de zéolithe Y-faujasite sèche et verser en pluie l'échantillon dans la solution constamment agitée. Une fois cette addition terminée, agiter énergiquement pendant 5 minutes. Laisser reposer entre 24 et 48 heures. Décanter, centrifuger ou filtrer si nécessaire pour obtenir au moins 200 ml de liquide clair.

3.4.2 Arsenic

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser l'arsenic par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International. La teneur en arsenic doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.3 Cadmium

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International

La teneur en cadmium doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.4 Chrome

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le chrome par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International

La teneur en chrome doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.5 Cuivre

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International. La teneur en cuivre doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.6 Fer

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le fer par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International. La teneur en fer doit être inférieure à 3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.7 Plomb

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le plomb par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en plomb doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.8 Manganèse

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le manganèse par spectrophotométrie d'absorption atomique. La teneur en manganèse doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.9 Mercure

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le mercure par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en mercure doit être inférieure à 0,1 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.10 Sélénium

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1,

doser le sélénium par spectrophotométrie d'absorption atomique.
La teneur en sélénium doit être inférieure à 1 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.11 Argent

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser l'argent par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en argent doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

3.4.12 Zinc

Dans la solution d'essai obtenue en suivant la procédure 3.4.1, doser le zinc par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique International.
La teneur en zinc doit être inférieure à 0,3 mg/kg de zéolithe Y-faujasite.

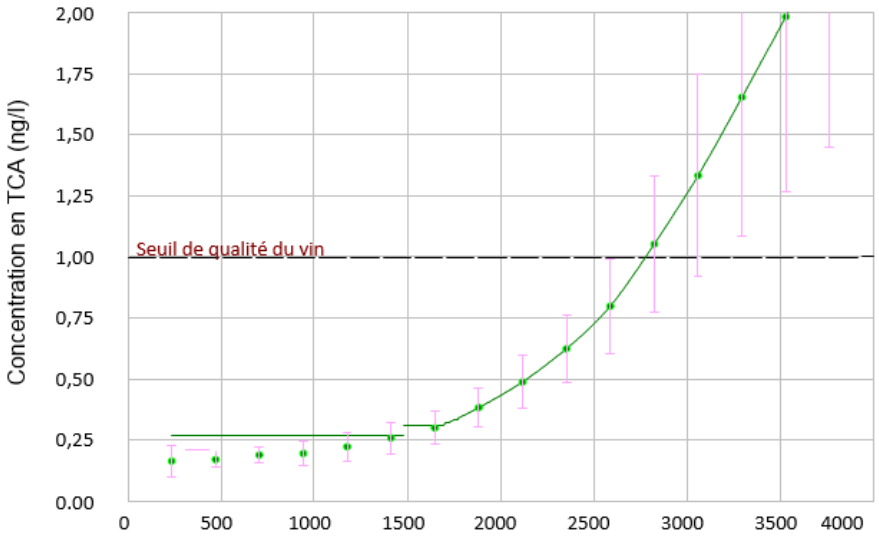
4.IDENTIFICATION

4.1 Test d'efficacité

Le test d'efficacité pour les blocs de filtration en profondeur contenant de la zéolithe Y-faujasite pour l'élimination sélective du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) consiste à traiter un vin contaminé par 20 ng/L de 2,4,6-trichloroanisole (TCA). Le bloc est placé dans un dispositif de filtration approprié et préalablement conditionné au moyen d'un rinçage à l'eau propre. Suite à cette préparation préalable, le vin contaminé est propulsé au travers du bloc de filtration à un taux de 15 litres par mètre carré de surface de filtration et par minute. Des échantillons du vin filtré sont prélevés environ tous les 235 litres par mètre carré de surface de filtration. Chaque échantillon de vin est analysé par CG-SM. Les données de concentration de TCA de chaque échantillon analysé sont alors intégrées afin de créer une courbe de rupture du bloc de filtration.

Efficacité des plaques de filtration en profondeur contenant de la zéolite Y-faujasite sélective

Courbe de rupture pour le TCA[a]



Volume filtré/surface de filtration

(l/m^2)

[a] Vin rouge ; 20 ng/l TCA ; taux de filtration de 15 l/m^2/min

La courbe de rupture présentée a été réalisée à partir de plusieurs blocs commerciaux produits à diverses dates de fabrication.

5. CONDITIONS DE STOCKAGE

Les plaques de filtration sélective incorporant des zéolithes Y-faujasite doivent être stockées dans leur emballage d'origine dans un endroit sans odeur, sec et aéré.

Chapitre II

Techniques Analytiques et de Contrôle

DOSAGE DU 5-(HYDROXYMETHYL)FURFURAL (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Le 5-(hydroxyméthyl)furfural (HMF) est dosé par CLHP (chromatographie liquide de partage en phase inverse)

2. APPAREILLAGE ET SOLUTIONS

2.1 Paramètres instrumentaux (à titre d'exemple)

Chromatographe en phase liquide
détecteur UV / visible
colonne : silice greffée de type octadécyle (C18), (longueur : 20 cm ; diamètre intérieur : 4,6 mm; granulométrie de la phase: 5 µm)
phase mobile : eau déminéralisée ultra filtrée - méthanol - acide acétique (80, 10, 3 : v/v/v)
débit: 0,5 ml/mn
longueur d'onde de détection : 280 nm
volume injecté : 20 µl

2.2 Préparation des solutions étalons

Solution d'HMF à 20 mg/l :
Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 20 mg d'HMF pesé à 0,1 mg près et compléter au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée ultra filtrée,
introduire 10 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau déminéralisée ultra filtrée;
la solution de HMF à 20 mg/l est à préparer chaque jour.

3. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons et la solution étalon de HMF sont injectés après filtration sur une membrane de 0,45 µm

4. MODE OPERATOIRE

La colonne chromatographique est stabilisée avec la phase mobile pendant environ 30 mn.

Déduire la concentration en HMF de l'échantillon à partir des surfaces des pics.

DOSAGE DE L'ARSENIC PAR GENERATION D'HYDRURE ET SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode s'applique à l'analyse de l'arsenic dans la gamme de concentration de 0 à 200 µg/l avec minéralisation préalable pour les produits œnologiques.

2. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

2.1. Principe de la méthode

Après réduction de l'arsenic(V) en arsenic(III), l'arsenic est dosé par génération d'hydrure et spectrométrie d'absorption atomique.

2.2. Principe de l'analyse (figure n°1)

La pompe péristaltique aspire la solution de borohydrure, la solution d'acide chlorhydrique et l'étalon ou l'échantillon.

L'hydrure formé dans le séparateur gaz-liquide, est entraîné par un gaz neutre (argon).

Le courant gazeux passe dans un desséchant constitué de chlorure de calcium.

L'arsenic de l'hydrure est analysé dans une cellule d'absorption en quartz posée sur la flamme d'un brûleur air-acétylène.

Le trajet optique de la lampe à cathode creuse du spectromètre d'absorption atomique passe dans la cellule en quartz.

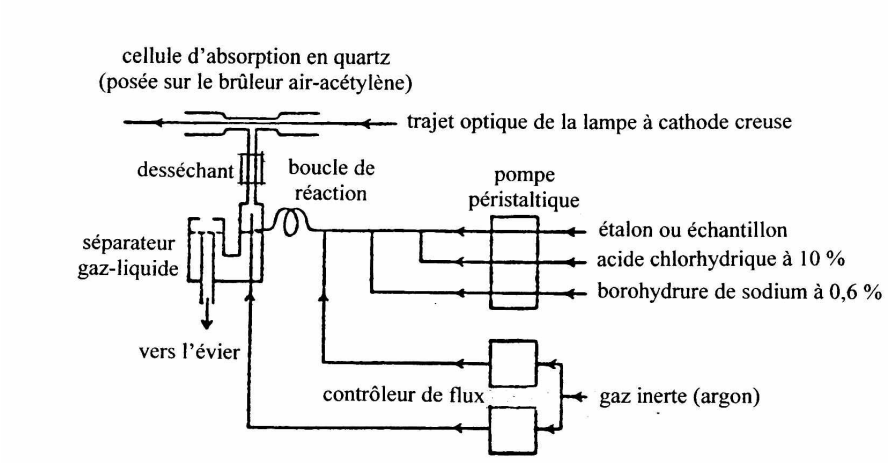


Figure n°1. Générateur d'hydrure

3. REACTIFS ET PREPARATION DES SOLUTIONS REACTIVES

3.1. Eau déminéralisée ultra-pure

3.2. Acide nitrique ultra-pur à 65 %

3.3. Iodure de potassium KI

3.4. Iodure de potassium à 10 % (m/v)

3.5. Acide chlorhydrique concentré

3.6. Acide chlorhydrique à 10 % (m/v)

3.7. Borohydrure de sodium $NaBH_4$

3.8. Hydroxyde de sodium NaOH en pastilles

3.9. Solution de borohydrure de sodium à 0,6 % (contenant 0,5 % de NaOH)

3.10. Chlorure de calcium $CaCl_2$ (utilisé comme desséchant)

3.11. Antimousse silicone

3.12. Solution-étalon d'arsenic à 1 g/l contenant 2 % d'acide nitrique et préparée à partir de l'acide suivant : H_3AsO_4 ½ H_20

3.13. Solution d'arsenic à 10 mg/l : placer 1 ml de la solution-étalon (3.12) dans une fiole de 100 ml ; ajouter 1 % d'acide nitrique (3.2) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

3.14. Solution d'arsenic à 100 µg/l : placer 1 ml de la solution d'arsenic à 10 mg/l (3.13) dans une fiole de 100 ml ; ajouter 1 % d'acide nitrique (3.2) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

4. APPAREILLAGE

4.1. Verrerie :

4.1.1. fioles jaugées de 50 et 100 ml (classe A)

4.1.2. pipettes jaugées de 1, 5, 10 et 25 ml (classe A)

4.1.3. vases cylindriques de 100 ml

4.2. Plaque chauffante thermostatée

4.3. Filtres sans cendres

4.4. Spectrophotomètre d'absorption atomique :

4.4.1. brûleur air-acétylène

4.4.2. lampe à cathode creuse (arsenic)

4.4.3. lampe au deutérium.

4.5. Accessoires :

4.5.1. générateur de vapeur (ou séparateur gaz-liquide)

4.5.2. cellule d'absorption en quartz, placée sur le brûleur air-acétylène

4.5.3. bouteille de gaz neutre (argon)

5. PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE ET DES ECHANTILLONS

5.1. Gamme d'étalonnage 0, 5, 10, 25 µg/l

Placer successivement 0, 5, 10, 25 ml de la solution d'arsenic à 100 µg/l (3.14) dans 4 fioles de 100 ml ; ajouter dans chaque fiole 10 ml d'iodure de potassium à 10 % (3.4) et 10 ml d'acide chlorhydrique concentré (3.5.) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1) ; laisser au repos, à température ambiante, pendant une heure.

5.2. Echantillons de produits œnologiques

L'échantillon est minéralisé par voie humide (cf. méthodes de minéralisation des échantillons avant dosage par spectrométrie d'absorption atomique) puis filtré. Transvaser 10 ml de minéralisat filtré dans une fiole de 50 ml ; ajouter 5 ml de iodure de potassium à 10% (3.4) et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré (3.5) ; ajouter une goutte d'antimousse (3.11) ; ajuster au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1). Laisser au repos, à température ambiante, pendant une heure. Filtrer sur un filtre sans cendres.

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Paramètres instrumentaux du spectrophotomètre d'absorption atomique (donnés à titre d'exemple)

6.1.1. flamme air-acétylène oxydante

6.1.2. longueur d'onde : 193,7 nm

6.1.3. largeur de la fente du monochromateur : 1,0 nm

6.1.4. intensité de la lampe à cathode creuse : 7 mA

6.1.5. correction de l'absorption non spécifique avec une lampe au deutérium

6.2. Détermination analytique

La pompe péristaltique aspire les solutions réactives (3.6) et (3.9) et les étalons ou les échantillons (5.1) ou (5.2).

Présenter successivement les solutions d'étalonnage (5.1) ; attendre suffisamment de temps afin que l'hydrure formé dans le séparateur gaz-liquide, passe dans la cellule d'absorption ; faire une lecture de l'absorbance pendant 10 secondes ; réaliser deux mesures ; le logiciel de l'ordinateur du spectromètre établit la courbe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en arsenic en µg/l).

Présenter ensuite les échantillons (5.2). Réaliser deux mesures.

6.3. Autocontrôles

Toutes les cinq déterminations, un blanc analytique et un étalon sont analysés afin de corriger une éventuelle dérive du spectromètre.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont directement imprimés par l'imprimante reliée à l'ordinateur.

La concentration en arsenic dans les produits œnologiques est exprimée en µg/kg en tenant compte de la prise d'essai.

8. CONTROLE DES RESULTATS

Le contrôle qualité est effectué en plaçant, après la gamme d'étalonnage et tous les cinq échantillons, un matériau de référence dont on connaît avec certitude la teneur en arsenic.

Une carte de contrôle est établie pour chaque matériau de référence utilisé. Les limites de contrôle ont été fixées à : +/- $2S_R$ intra (S_R intra : écart-type de reproductibilité).

9. BIBLIOGRAPHIE

9.1. PESQUE M., 1982. Dosage de l'arsenic dans le vin. Rapport de stage. Diplôme d'œnologue. Institut d'œnologie de Bordeaux.

9.2. GAYE J., MEDINA B., 1998. Dosage de l'arsenic dans le vin par spectrométrie d'absorption atomique. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°1069.

9.3. GAYE J., MEDINA B., 1999. Arsenic dans les vins. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°1087.

TECHNIQUES ANALYTIQUES ET DE CONTROLE MICROBIOLOGIQUES

ANALYSES COMMUNES A TOUTES LES MONOGRAPHIES

AG 4/82-OEN
OENO 16/2003
OENO 17/2003
OIV/OENO 328/2009
OIV/OENO 329/2009,
OIV-OENO 632-2021

1. Réhydratation préalable des levures (Saccharomyces et non-Saccharomyces) : LSA (Levures sèches actives), AFY (Levures congelées), COY (Levures compressées), CRY (Crème de levure), ENY (Levures encapsulées et levures immobilisées), « levain de tirage ».

Peser stérilement, environ 10 g de préparation (noter le poids exact pour le calcul final de la concentration) ;

Ajuster stérilement à 100mL dans de l'eau peptonée saline et stérile* à 20-37 °C ou selon les indications du fabricant ;
homogénéiser doucement à l'aide d'un barreau, d'un stomacher ou d'un agitateur magnétique pendant 5 min ;
arrêter l'agitation et laisser reposer pendant 20 minutes, à une température ambiante de 20-30 °C ;
homogénéiser de nouveau à température ambiante pendant 5 min ;
sous conditions stériles, préparer des dilutions décimales en série dans de l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques sur la solution mère homogénéisée.

Dans le cas des levains de tirage utilisés pour les vins effervescents, prélever stérilement 1 mL, préparer des dilutions décimales en série dans l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques sur la solution mère homogénéisée.

* Solution peptone-sel : peptone bactériologique : 1 g/L ; chlorure de sodium : 8,5 g/L, pH final : 7,0.

2. Réhydratation préalable des préparations de bactéries lactiques

peser stérilement, environ 10 g de solution de bactéries lactiques (noter le poids exact pour le calcul final de la concentration) ;
sous conditions stériles, ajuster à 100 mL avec de l'eau peptonée saline et stérile* (25 °C) ;
homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique ou d'un stomacher pendant 5 min;
arrêter l'agitation et laisser reposer pendant 20 min à température ambiante (20-30 °C) ;
homogénéiser de nouveau pendant 5 min à température ambiante ;
sous conditions stériles, préparer des dilutions décimales en série dans de l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques.

* Solution peptone-sel : peptone bactériologique : 1 g/L ; chlorure de sodium : 8,5 g/L, pH final : 7,0.

3. Contrôle microbiologique d'autres produits dans le Codex œnologique international

Produits pour lesquels le contrôle des levures et/ou des bactéries, et/ou moisissures est requis.

peser stérilement environ 10 g du produit œnologique à contrôler (noter le poids exact pour le calcul final de la concentration) ;
sous conditions stériles, ajuster à 100 mL avec de l'eau peptonée saline et stérile*;
homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique ou d'un stomacher pendant 5 min;
sous conditions stériles, préparer des dilutions décimales en série dans de l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques.

* Solution peptone-sel : peptone bactériologique : 1 g/L ; chlorure de sodium : 8,5 g/L, pH final : 7,0.

4. Dénombrement des levures totales

Milieu YM (MALT WICKERHAM) gélosé

Agar-agar bactériologique	15 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Peptone	5 g

Glucose	10 g
Eau	q.s.p. 1000 mL

Milieu YPD

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
Agar-agar	10 g
Eau	q.s.p. 1000 mL

Juste après la préparation, le milieu est autoclavé à 120 °C pendant 20 min.

En cas de temps d'incubation prolongé, ajouter du chloramphénicol à une concentration finale de 100 mg/L afin de prévenir la croissance bactérienne.
Après ensemencement avec les dilutions d'échantillon appropriées permettant d'atteindre 30-300 colonies, les boîtes sont incubées à 25 - 30°C en aérobiose pendant 48 à 72 heures.
Compter le nombre d'UFC dans les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies et rapporter au poids de matière sèche.
En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.

5. Dénombrement des levures non-Saccharomyces

5.1 Milieu lysine

Les levures sont cultivées dans un milieu lysine dont la composition est la suivante :

Agar-agar	20 g
Monohydrochlorure de L-lysine	5 g
Glucose	1 g
Pourpre de bromocrésol	0,015 g
Eau	q.s.p. 1000 mL
Ajuster	pH 6,8 ± 0,2

Porter à ébullition pendant 1 min afin de garantir une dissolution complète, puis passer à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min.

En cas de temps d'incubation prolongé, ajouter du chloramphénicol à une concentration finale de 100 mg/L afin de prévenir la croissance bactérienne.

Après ensemencement avec les dilutions de l'échantillon, les boîtes sont incubées à 25 °C ou 30 °C pendant 48 à 96 heures.

Compter le nombre d'UFC (boîtes entre 30 et 300 colonies) et rapporter au poids de matière sèche.

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut-être utilisés.

5.2. Milieu YPD additionné de cycloheximide à 10 mg/L et incubation 6-7 jours en aérobiose

En cas de temps d'incubation prolongé, ajouter du chloramphénicol à une concentration finale de 100 mg/L afin de prévenir la croissance bactérienne.

6. Dénombrement des bactéries lactiques revivifiables

MRS (Man, Rogosa et Sharpe) modifié

Les bactéries sont cultivées dans un milieu MRS (Man, Rogosa, Sharpe 1960), additionné de jus de tomate, dont la composition est la suivante :

Agar-agar	15 g
Bacto-peptone	10 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	4 g
Acétate de sodium	5 g
K_2HPO_4	2 g
Citrate trisodique	2 g
$MgSO_4$ à 100 mg/L	2,5 mL
$MnSO_4$ à 20 mg/L	2 mL
Tween 80	1 mL
Acide DL-malique	5 g
Jus de tomate*	200mL
Glucose :	20 g ou glucose : 10 g + fructose : 10 g
HCl ou NaOH q.s.p. pH	4,8
Eau distillée q.s.p.	1000 mL

q.s.p (quantité suffisante pour)

*Le jus de tomate est destiné à améliorer la croissance des bactéries lactiques. Préparation : jus de tomate commercial (sans additifs) ou fait maison, centrifugé à 4000 g pendant 20 min et filtré si nécessaire ; utiliser le jus clair.

Autoclavage à 110°C pendant 20 min

Au moment du coulage du milieu dans la boîte de Petri, additionner de la pimaricine à une concentration finale de 10 mg/L afin d'inhiber les levures et les moisissures

Incubation à 25 °C pendant 8 à 10 jours en anaérobiose

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.

7. Dénombrement des moisissures

Milieu Czapek-Dox gélosé	
Agar-agar	15 g
Saccharose	30 g
$NaNO_3$	3 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4$	0,01 g
Eau	q.s.p. 1000 mL
ajuster	pH 7

Autoclavage à 120 °C pendant 20 min

Ajouter directement dans la boîte de Petri contenant le milieu du chloramphénicol à une concentration finale de 100 mg/L afin d'inhiber les bactéries.

Incuber à 20 °C pendant 10 jours en aérobiose.

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.

8. Dénombrement des bactéries acétiques

Agar-agar bactériologique	20 g
Extrait de levure	5 g
Acides aminés de caséine	5 g
Glucose	10 g
Ajuster à	pH 4,5
Eau	q.s.p. 1000 mL

Autoclavage à 120°C pendant 20min.

Lors de l'ajout dans la boîte de Petri, additionner au milieu de la pimaricine à une concentration finale de 100 mg/L afin d'inhiber les levures et les moisissures, ainsi que de la pénicilline à une concentration finale de 12,5 mg/L afin d'inhiber les bactéries lactiques.

Incuber à 25 °C pendant 4 jours en aérobiose.

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.

9. Dénombrement des salmonelles

9.1. Principe

L'échantillon subit une phase de pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée 16 à 20H à 37 °C. Suite à cette étape, une partie aliquote de ce bouillon est ensemencé dans un dispositif pour culture. Celui-ci contenant un milieu spécifique et 2 tubes spéciaux (constitués de deux parties) est incubé 24H à 41 °C. Les S*almonella* migrent de la partie inférieure (milieu sélectif) vers la partie supérieure du tube (milieu indicateur). La présence de *Salmonella* se traduit par un changement de coloration de cette dernière.

9.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture et les diverses préparations sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen. Le matériel souillé est soumis à une destruction par autoclave 1H à 120 °C ou par immersion dans l'eau de Javel pendant 18H au minimum (cf procédure de nettoyage).

Eprouvette en verre stérile de 125 ml.

Sac stomacher stérile.
Barrette de fermeture.
Stomacher.
Tubes stériles en verre 16x160 mm.
Tubes à essais en verre 20x220 cotonnés.
Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.
Pipettes stériles en matière plastique de 10 ml graduées en 0,1 ml.
agitateur de tubes.
dispositif pour culture à réhydrater.
une seringue stérile en matière plastique de 2 ml avec une aiguille stérile.
Pince brucelle.
Clé pour dévisser les tubes A et B du dispositif de culture.
Lame de verre propre.
Pipettes Pasteur cotonnées stériles.
Öse.
Etuve à 41 °C ± 1 °C.
Etuve à 37 °C ± 1 °C.
Bec Bunsen.

9.3. Réactifs

Eau peptonée stérile (EPT)
Eau distillée stérile (EDS).
Flacon stérile de 500 ml vissé prérempli avec 125 ml d'EPT.
Flacon stérile de 500 ml vissé prérempli avec 225 ml d'EPT.
Milieu spécial pour *Salmonella* : SRTEM.
Disque de novobiocine (1,8 mg de novobiocine).
Gélose Hektoën (cf DOMIC-08).
Galerie API 20E.
Tubes de gélose TSAYE inclinée.
Solution de NaCl stérile à 8,5 g/l.
Sérum anti *Salmonella.*

9.4. Mode opératoire

9.4.1 Préparation de la suspension mère
Elle diffère selon la nature des produits et le taux de dilution
Ajouter dans un sachet stomacher une prise d'essai de 25 gramme(s) ou millilitre(s) de produit à une quantité d'eau peptonée 9 fois supérieure
Fermer le sachet par thermosoudure ou à l'aide d'une barrette.
Broyer au stomacher pendant 1 minute.

9.*4.1.1 Phase de pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide :*
Incuber la suspension mère 16 à 20H à 37 °C ± 1 °C.

9.*4.1.2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides*
Préparation du dispositif de culture

- dévisser le couvercle du récipient pour culture ;
- ajouter de l'EDS jusqu'à la ligne 1 marquée sur le corps du récipient.

Remarque : La base des tubes A et B doit être située sous le niveau de l'eau.

- adapter l'aiguille à la seringue et s'assurer que le piston de la seringue est enfoncé (absence d'air) ;
- introduire verticalement l'aiguille fixée à la seringue dans la pastille caoutchoutée au centre du bouchon du tube A (bouchon bleu) en s'assurant que l'aiguille soit visible sous ce bouchon ;
- tirer délicatement sur le corps de la seringue jusqu'à ce que le liquide atteigne la ligne 3 marquée sur le corps du récipient.

Remarque : ne pas aspirer de liquide dans la seringue**.**
cette opération doit prendre environ 5 secondes.

- Répéter l'opération pour le tube B (bouchon rouge) ;
- Bien revisser le bouchon du récipient de culture ;
- Appuyer le côté du récipient sur un agitateur de tube en le maintenant au moins 5 secondes.

Remarque : le liquide dans les tubes A et B doit être fortement agité.

- Laisser reposer le dispositif de culture au moins pendant 5 minutes **;**
- Dévisser le bouchon du récipient de culture et verser le milieu SRTEM jusqu'à ce que le niveau atteigne la ligne 2 marquée sur le corps du récipient ;
- Ajouter à l'aide d'une pince brucelle un disque de novobiocine ;
- Enlever les bouchons des tubes A (bleu) et B (rouge) à l'aide de la clé puis les jeter.

Remarque : éviter de toucher avec les mains les tubes ainsi que les parois internes du dispositif.

Inoculation du dispositif de culture

- Homogénéiser la culture de pré-enrichissement ;
- Identifier le dispositif de culture en notant le numéro d'analyse sur son couvercle ;
- Dévisser le couvercle.
- A l'aide d'une pipette de 2 ml introduire 1 ml de culture de pré-enrichissement dans le récipient de culture.
- Visser le couvercle sur le dispositif de culture.
- Noter la date et l'heure d'incubation.
- Incuber 24H ±30 mn à 41 °C ± 1 °C en position strictement verticale.

9.4.2 Lecture et interprétation

Elle est réalisée en observant, à travers les parois du récipient, la partie supérieure des tubes A et B.

La présence éventuelle de *Salmonella* se caractérise par une modification de la couleur du milieu indicateur situé à la partie supérieure de l'un des 2 tubes ou des 2 tubes :

RÉACTION	***TUBE A***	**TUBE B**
positive :	tous les degrés de coloration noire.	tous les degrés de coloration rouge ou noire
négative :	absence de coloration noire	absence de coloration rouge ou noire

Le ou les tube(s) présentant une réaction positive est ou sont soumis à un isolement sur gélose sélective.

- Sécher les boîtes de gélose Hektoën dans une étuve à 46 °C ± 1 °C jusqu'à disparition complète des gouttelettes à la surface du milieu (couvercle enlevé et surface de la gélose tournée vers le bas).
- Prélever une öse à la surface du milieu indicateur positif et l'inoculer dans 5 ml d'EPT, conditionnés dans un tube stérile en verre 16x160 mm, pour obtenir une dilution de la culture.
- Procéder ainsi pour chacun des tubes positifs.

- Identifier la boîte en notant sur le couvercle le n° d'analyse ainsi que la lettre du tube en cours de confirmation.
- Homogénéiser la dilution de la culture, en prélever une öse
- Isoler à la surface de la gélose Hektoën de façon à permettre le développement de colonies isolées.
- Incuber 24H à 37 °C ± 1 °C.
- Sélectionner au moins 2 colonies isolées considérées comme typiques :

9.4.3. Confirmation

9.*4.3.1 Tests biochimiques*

- Identifier les différentes colonies par l'emploi de galeries miniaturisées spécifiques
  (galerie API 20E) en se reportant aux prescriptions du fabricant.
- Incuber 24H à 37 °C ± 1 °C.
- Ensemencer en parallèle : une gélose pour confirmer la pureté de la souche.
  une gélose TSAYE inclinée pour le sérotypage.
- Incuber 24H à 37 °C ± 1 °C.
- Lire la galerie API20E en suivant les indications du fabricant.
- Comparer le profil obtenu aux profils types donnés par le fabricant.
- Conserver la gélose TSAYE inclinée au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

9.*4.3.2 Tests sérologiques :*

Ils sont réalisés lorsque le profil de la souche correspond à une *Salmonella.* Les tests sont effectués selon les prescriptions définies par le fabricant à partir de culture pure obtenue sur la gélose et après élimination des souches auto-agglutinables.

Elimination des souches auto-agglutinables :

- Déposer une goutte de solution saline à 8,5 g/l sur une lame de verre
  parfaitement propre.
- Y disperser un peu de culture prélevée sur la gélose nutritive pour obtenir une suspension homogène et trouble à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Faire osciller la lame durant 30 à 60s.
- Observer sur fond noir à l'aide d'une loupe : si on observe des amas plus ou moins distincts la souche est considérée

comme auto-agglutinable et ne peut être soumise au sérotypage.

9.5. Résultats

Selon les résultats de l'interprétation des tests biochimiques et sérologiques le résultat est exprimé comme suit :

- Présence de *Salmonella* dans m gramme(s) ou ml de produit.

- Absence de *Salmonella* dans m gramme(s) ou ml de produit.

Schéma du mode opératoire

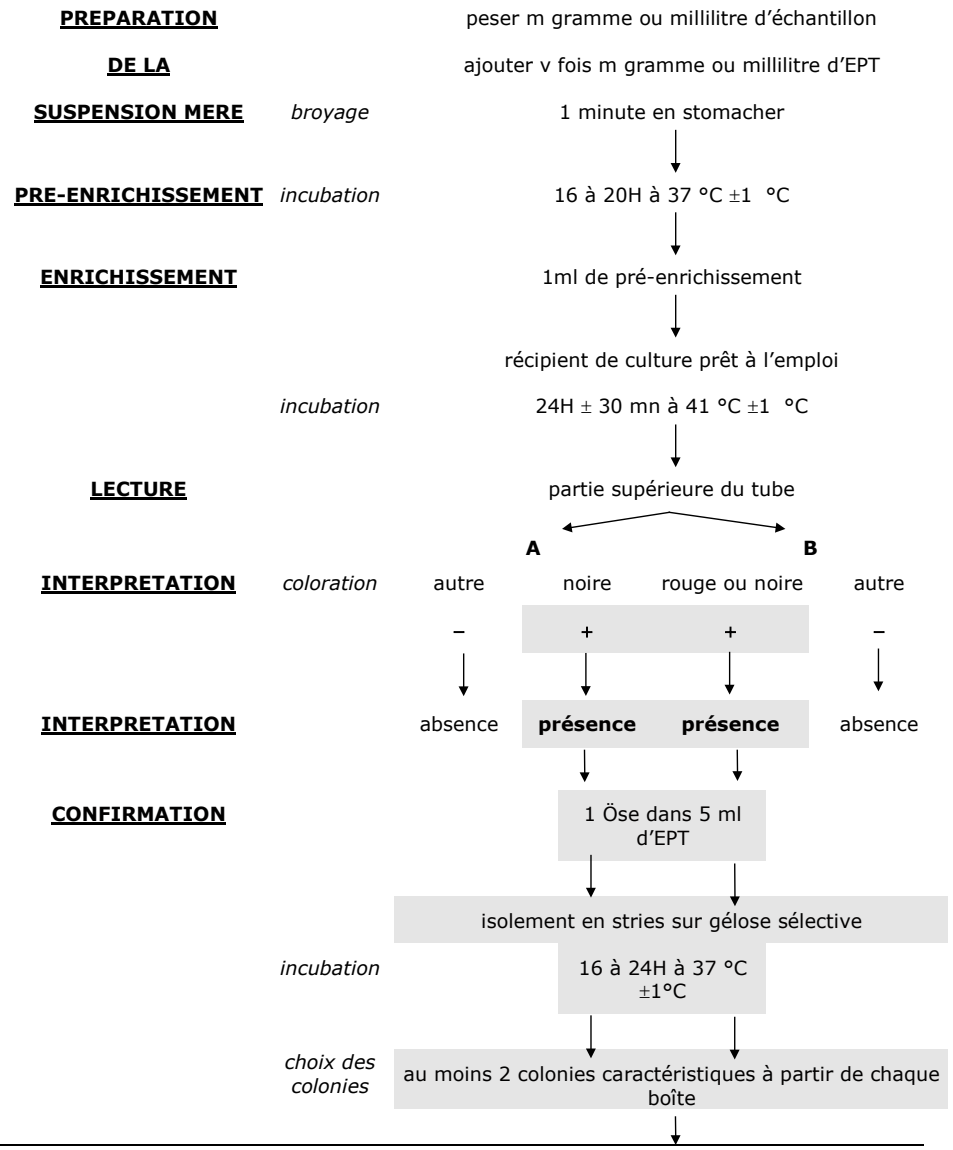

PREPARATION
peser m gramme ou millilitre d'échantillon
DE LA
ajouter v fois m gramme ou millilitre d'EPT
SUSPENSION MERE
broyage
1 minute en stomacher
PRE-ENRICHISSEMENT
incubation
16 à 20H à 37 °C ±1 °C
ENRICHISSEMENT
1ml de pré-enrichissement
récipient de culture prêt à l'emploi
incubation
24H ± 30 mn à 41 °C ±1 °C
LECTURE
partie supérieure du tube
A
B
INTERPRETATION
coloration
autre
noire
rouge ou noire
autre
–
+
+
–
INTERPRETATION
absence
présence
présence
absence
CONFIRMATION
1 Öse dans 5 ml d'EPT
isolement en stries sur gélose sélective
incubation
16 à 24H à 37 °C ±1°C
choix des colonies
au moins 2 colonies caractéristiques à partir de chaque boîte
cf schéma des tests de confirmation

Schéma des tests de confirmation

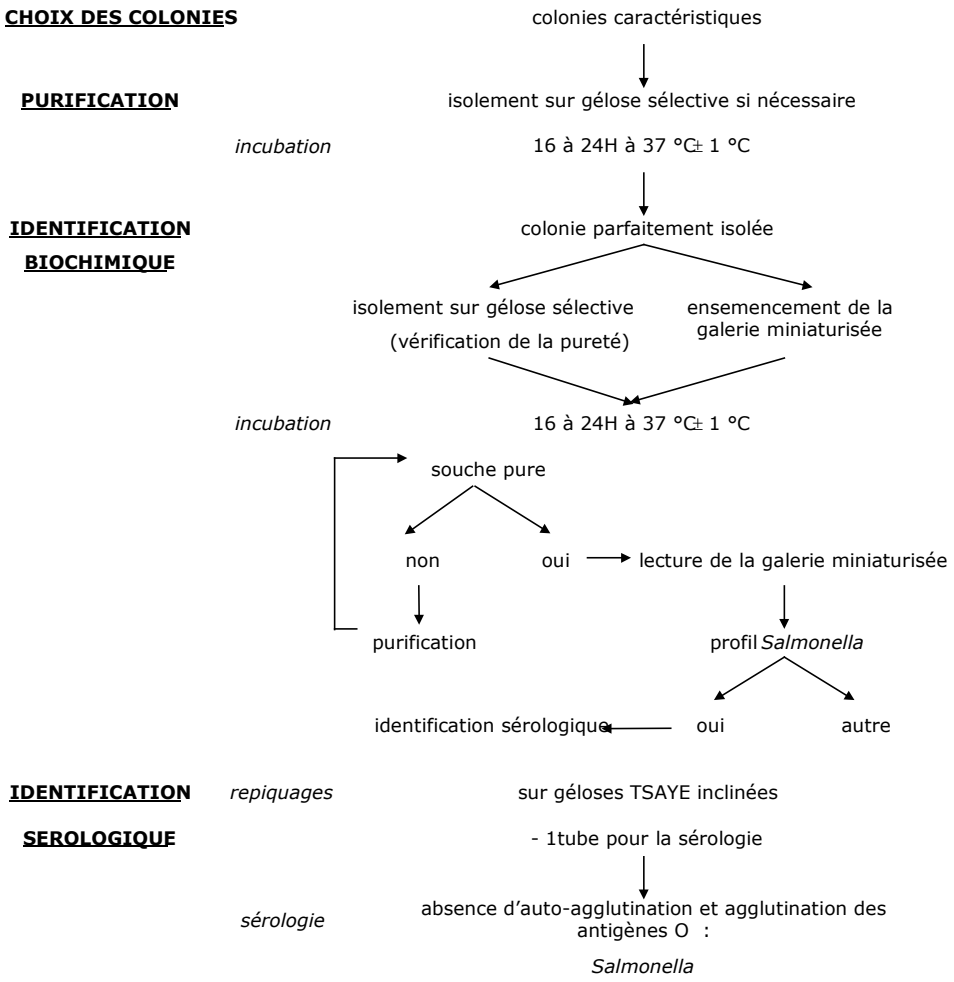


Schéma des interprétations biochimiques et sérologiques.

Réactions biochimiques	Auto-agglutination	Réactions sérologiques	Interprétation
typiques	non	antigène " O " positive	*Salmonella*
typiques	non	réactions négatives	envoi à un centre agréé
typiques	oui	non effectuées	pour détermination du sérotype

10. Dénombrement des *Escherichia coli* par comptage des colonies obtenues à 44 °C

10.1. Principe

Un ensemencement en profondeur en gélose Rapid *E.coli* est réalisé en boite de Pétri pour chacune des dilutions retenues. Après une incubation de 24H à 44 °C, toutes les colonies caractéristiques apparues sont dénombrées.

10.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen.

Boites de Pétri stériles en matière plastique diamètre 90 millimètres.
Tubes à essais stériles en verre 16x160 cotonnés.
Portoir de tubes.
Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.
Bain d'eau à 100 °C ± 2 °C.
Bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
Agitateur de tubes.
Etuve à 44 °C ± 1 °C.
Bec Bunsen.
Compteur de colonies.

10.3. Réactifs

Diluant stérile pour dilutions décimales : tryptone sel (TS).
Tubes 16x160 stériles pré-remplis avec 9ml de TS stérile.
Gélose Rapid'*E.coli* en surfusion (R.EC).

10.4. Mode opératoire

10.4.1 Le milieu gélosé

- Faire fondre la gélose R.EC au bain d'eau bouillant en évitant toute surchauffe.
- Ne jamais utiliser un milieu de culture à une température supérieure à 50 °C.
- Pour une utilisation immédiate maintenir la gélose au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
- Ne pas maintenir une surfusion de plus de 8H.

- Pour une utilisation différée maintenir la gélose en surfusion à l'étuve à 55 °C ± 1°C.
- Les milieux de culture fondus et non utilisés dans les 8H ne seront jamais resolidifiés pour une utilisation ultérieure.

10.4.2 Mise en culture

- Homogénéiser chaque dilution avant inoculation dans les boîtes de Pétri et avant la réalisation des dilutions décimales.
- Transférer 1 ml, de la suspension mère et ou des dilutions décimales retenues, dans les boites de Pétri respectives en changeant de pipette à chaque dilution.
- Introduire, au plus 20 minutes après l'inoculum, 15 à 20 ml de R.EC maintenue au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
- Homogénéiser doucement par agitation.
- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut).
- Couler environ 4 à 5 ml de R.EC maintenue à 47 °C ± 2 °C.

- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut).
- Retourner les boites et incuber aussitôt à l'étuve 24H ± 2H à 44 °C ± 1 °C.

10.4.3 Dénombrement

Les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives sont retenues pour le dénombrement.

Si seule la boîte ensemencée avec 1ml de la 1ère dilution renferme des colonies caractéristiques et en nombre inférieur à 15, elle sera retenue pour le dénombrement.

Les colonies caractéristiques sont dénombrées à l'aide d'un compteur ou manuellement après 24H ± 2H d'incubation.

10.5 Résultats

10.5.1 Cas général

Les boites contiennent entre 15 et 150 colonies caractéristiques, au niveau de deux dilutions successives.

10.5.1.1 Mode de calcul

Les 2 boites retenues présentent entre 15 et 150 colonies caractéristiques. Le nombre N de microorganismes dénombrés à 44,5 °C par millilitre ou par gramme de produit est obtenu en calculant la moyenne pondérée sur les 2 boites retenues.

$= \frac{\quad}{\quad}$

$\sum c$: somme des colonies caractéristiques dénombrées sur les 2 boites retenues

d : taux de dilution correspondant à la 1ère dilution

10.5.1.2 Expression des résultats

- Arrondir le nombre N à 2 chiffres significatifs
- Exprimer en puissance de 10

ex. : 1,6 10^3 / g ou ml

10.5.2 Estimation des petits nombres

Si la boite ensemencée avec 1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse renferme moins de 15 colonies caractéristiques, exprimer le résultat comme suit :

$$N = c\frac{1}{d}$$

c : somme des colonies caractéristiques dénombrées
d : taux de dilution

Si la boite ensemencée avec 1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse ne contient aucune colonie exprimer le résultat comme suit :

$N = < 1\frac{1}{d}$ micro-organisme par g ou ml

d : taux de dilution

11. Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage et confirmation des colonies obtenues à 37 °C

11.1. Principe

A partir de l'échantillon (produit liquide) ou de la solution mère (autres produits), on réalise des dilutions décimales et, en parallèle, on ensemence en surface 1 gélose Baird Parker précoulée en boîte de Pétri avec chacune des dilutions retenues.
Après une incubation de 48H à 37 °C les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques apparues sont dénombrées puis confirmées par le test de la coagulase.

11.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen.

- Tubes à essais stériles en verre 16x160 cotonnés.
- Tubes à hémolyse stériles en matière plastique avec bouchon plastique.
- Portoir de tubes.
- Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.
- Etaleurs stériles en matière plastique.
- Pipettes Pasteur stériles.
- Agitateur de tubes.
- Etuve 37 °C ± 1 °C.
- Bec Bunsen.
- Compteur de colonies.

11.2.1 Réactifs

- Diluant stérile pour dilutions décimales : tryptone sel (TS).
- Tubes 16x160 stériles pré-remplis avec 9ml de TS stérile.
- Gélose Baird Parker précoulée en boîte de Pétri.
- Tubes pré-remplis avec 5ml de bouillon cerveau coeur (stériles).
- Plasma de lapin lyophilisé à réhydrater au moment de l'emploi.

11.2.2 Mode opératoire

11.2.2.1 Mise en culture

- Sécher les boîtes de gélose dans une étuve à 46 °C ± 1 °C jusqu'à disparition complète des gouttelettes à la surface du milieu. (couvercle enlevé et surface de la gélose tournée vers le bas).

- Homogénéiser chaque dilution avant inoculation à la surface des boites gélosées et avant la réalisation des dilutions décimales.
- Déposer 0,1 ml, de la suspension mère et / ou des dilutions décimales retenues, à la surface de la gélose en changeant de pipette à chaque dilution.
- Etaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à l'aide d'un étaleur sans toucher les bords de la boîte.

- Laisser les boîtes, couvercle fermé, pendant 15 minutes à température ambiante.
- Incuber à l'étuve 48H ± 2H à 37 °C ± 1 °C

11.2.2.2 Dénombrement

Les boites contenant moins de 150 colonies caractéristiques et / ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives sont retenues ; mais l'une d'entre elle doit renfermer au moins 15 colonies. Les colonies caractéristiques et / ou non caractéristiques sont dénombrées soit à l'aide d'un compteur soit manuellement.

colonies caractéristiques après 48H ± 2H d'incubation :

- Noires ou grises, brillantes et convexes dont le diamètre est au minimum de 1 mm et au maximum 2,5 mm entourées d'un halo d'éclaircissement et de précipitation.

colonies non caractéristiques après 48H ± 2H d'incubation :

- Noires et brillantes avec ou sans bord blanc étroit avec les halos d'éclaircissement et de précipitation absent ou à peine visibles.
- Grises dépourvues de zone claire.

11.2.2.3 Confirmation

Prélever 3 colonies caractéristiques ou 3 colonies de chaque type (caractéristique ou non caractéristique) et les soumettre au test de la coagulase.

Test de la coagulase :

a) Culture en bouillon :

- Prélever une partie de la colonie sélectionnée à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée à la flamme du bec Bunsen et l'ensemencer dans un bouillon cerveau coeur.
- Répéter cette manipulation pour les autres colonies sélectionnées.

- Identifier les tubes par le n° de l'échantillon et sa dilution avec un marqueur bleu pour les colonies caractéristiques et un marqueur vert pour les colonies non caractéristiques.
- Incuber à 37 °C ± 1 °C pendant 20 à 24H ± 2H.

b) Recherche de la coagulase libre :

- Ajouter 0,5 ml de la culture obtenue en bouillon cerveau coeur à 0,5 ml de plasma de lapin réhydraté dans un tube à hémolyse stérile identifier comme ci-dessus.
- Répéter cette manipulation pour chaque culture en bouillon.
- Incuber 4 à 6H à 37 °C ± 1 °C.
- Vérifier la présence d'un coagulum sinon examiner le tube à 24H ± 2H d'incubation.

11.2.3 Résultats

La coagulase est considérée comme positive quand le coagulum occupe les ¾ du volume initialement occupé par le liquide.

11.2.3.1 Cas général

Les boites contiennent au maximum 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques.

Mode de calcul :

- Nombre de Staphylocoques à coagulase positive pour chaque boîte : a

$$a = \frac{b^c}{A^c} \times c^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times c^{nc}$$

A^c est le nombre de colonies caractéristiques repiquées;

A^{nc} est le nombre de colonies non caractéristiques repiquées;

b^c est le nombre de colonies caractéristiques de Staphylocoques coagulase positive ;

b^{nc} est le nombre de colonies non caractéristiques de Staphylocoques coagulase positive

c^c est le nombre total de colonies caractéristiques de Staphylocoques coagulase positive pour la boîte retenue ;

c^{nc} est le nombre total de colonies non caractéristiques de Staphylocoques coagulase positive pour la boîte retenue.

Arrondir la valeur obtenue au nombre entier le plus proche.

- Nombre de Staphylocoques à coagulase positive dans la prise d'essai : N

C'est la moyenne pondérée, calculée de la façon suivante à partir des deux dilutions successives retenues :

$$N = \frac{\sum a}{1{,}1 \times F} \times 10$$

Staphylocoques à coagulase positive par g ou ml

∑a : somme des colonies de Staphylocoques à coagulase positive identifiées sur les 2 boîtes retenues

F : taux de dilution correspondant à la 1ère dilution retenue.

Expression des résultats :

- arrondir le nombre N à deux chiffres significatifs
- exprimer en puissance de 10

ex.:	valeur obtenue	valeur arrondie	résultat
	36364	36000	$3{,}6\ 10^4$

11.2.3.2 Estimation des petits nombres :

Si la boîte ensemencée avec 0,1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse renferme moins de 15 colonies, le résultat sera exprimé comme suit :

$$N = a\frac{1}{d} \times 10$$ Staphylocoques coagulase positive par g ou ml

a : nombre de Staphylocoques à coagulase positive identifiés.
d : taux de dilution de la 1ère dilution retenue pour l'analyse.

Si la boîte ensemencée avec 0,1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse ne contient aucun Staphylocoque à coagulase positive exprimer le résultat comme suit :

$$N < \frac{1}{d} \times 10$$ Staphylocoques coagulase positive par g ou ml

d : Taux de dilution de la 1ère dilution retenue pour l'analyse.

12. Dénombrement des coliformes par comptage des colonies obtenues à 30 °C

12.1. Principe

Un ensemencement en profondeur en gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) est réalisé en boite de Pétri pour chacune des dilutions retenues. Après une incubation de 24H à 30 °C toutes les colonies caractéristiques apparues sont dénombrées.

12.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen.

- Boites de Pétri stériles en matière plastique diamètre 90 millimètres.
- Tubes à essais stériles en verre 16 x 160 cotonnés.
- Portoir de tubes.
- Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.
- Bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
- Agitateur de tubes.
- Etuve 30 °C ± 1 °C.
- Etuve 55 °C ± 1 °C.
- Bec Bunsen.
- Compteur de colonies

12.3. Réactifs

- Diluant stérile pour dilutions décimales : tryptone sel (TS)
- Tubes de 16 × 160 stériles pré-remplis avec 9ml de TS stérile
- Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) en surfusion.

12.4. Mode opératoire

12.4.1 Le milieu gélosé

- Dès sa préparation maintenir la gélose VRBL en surfusion au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C (utilisation immédiate).
- Ne jamais utiliser un milieu de culture à une température supérieure à 50 °C.
- Ne pas maintenir une surfusion de plus de 8H.
- Pour une utilisation différée maintenir la gélose en surfusion dans l'étuve à 55 °C ±1 °C.
- Les milieux de culture fondus et non utilisés dans les 8H ne seront jamais resolidifiés pour une utilisation ultérieure.

12.4.2 Mise en culture

- Homogénéiser chaque dilution avant inoculation dans les boîtes de Pétri et avant la réalisation des dilutions décimales.
- Transférer 1 ml, de la suspension mère et/ou des dilutions décimales retenues, dans les boites de Pétri respectives en changeant de pipette à chaque dilution.
- Introduire, au plus 20 minutes après l'inoculum, 15 à 20 ml de VRBL maintenue au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C
- Homogénéiser doucement par agitation.
- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut).
- Couler environ 5 ml de VRBL maintenue au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut).
- Retourner les boites et incuber aussitôt à l'étuve 24H ± 2H à 30 °C ± 1 °C.

12.4.3 Dénombrement

Les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives sont retenues ; mais l'une d'entre elles doit renfermer au moins 15 colonies caractéristiques.

Si seule la boîte ensemencée avec 1ml de la 1ère dilution renferme des colonies caractéristiques et en nombre inférieur à 15, elle sera retenue pour le dénombrement.

Les colonies caractéristiques sont dénombrées à l'aide d'un compteur ou manuellement.

colonies caractéristiques après 24H ± 2H d'incubation

- colonies violacées entourées, parfois, d'une zone rougeâtre (précipitation de la bile)
- diamètre ≥ 0,5 mm

12.5. Résultats

12.5.1 Cas général

Les boites contiennent moins de 150 colonies, caractéristiques ou non, au niveau de deux dilutions successives mais l'une d'entre elles renferme au moins de 15 colonies caractéristiques

mode de calcul :

Le nombre N de microorganismes dénombré à 30°C par millilitre ou par gramme de produit est obtenu en calculant la moyenne pondérée sur les 2 boites retenues.

$$= \frac{\quad}{\quad}$$

$\sum c$: somme des colonies caractéristiques dénombrées sur les 2 boites retenues

d : taux de dilution correspondant à la 1ère dilution

expression des résultats :

- arrondir le nombre N à 2 chiffres significatifs
- exprimer en puissance de 10

ex. : 1,6 10^3 / g ou ml

12.5.2 Estimation des petits nombres

Si la boite ensemencée avec 1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse renferme moins de 15 colonies caractéristiques, le résultat sera exprimé comme suit :

$$N = c\frac{1}{d}$$

c : somme des colonies caractéristiques dénombrées
d : taux de dilution

Si la boite ensemencée avec 1ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse ne contient aucune colonie exprimer le résultat comme suit :

$$N = < \; 1\frac{1}{d}$$ micro-organisme par g ou ml

d : taux de dilution.

ANNEXE 1

EXAMEN DES MÉTHODES DE RECHERCHE DES COLIFORMES, *Escherichia coli* et *Staphillococcus*

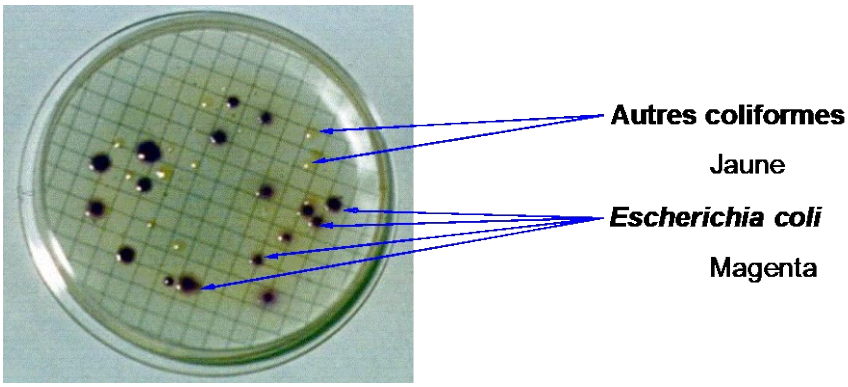
MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR COLIFORMES. GÉLOSE AU DÉSOXYCHOLATE

Ingrédients (g)/l	
Peptone	10,0
Lactose	10,0
Désoxycholate de sodium	1,0 (Inhibition de la flore associée aux coliformes)
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate dipotassique	2,0
Citrate ferrique d'ammonium	1,0
Citrate de sodium	1,0
Gélose	15,0
Rouge neutre	0,03



MILLIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR *Escherichia coli* TEM

Le lauryl sulfate de sodium et le désoxycholate de sodium sont utilisés comme facteurs sélectifs, en raison de leurs capacités à inhiber le développement de cocci Gram + et bactéries sporulées. Le caractère différentiel de cette méthode résulte du chromogène 5-brome-6-chlore-indolyle-β-D-glucuronide.



MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR *Staphillococcus*

Milieu Giolitti et Cantoni

Composition (g) pour 1 litre de milieu :	
Tryptone	10,0
Extrait de viande	5,0
Extrait autolytique de levure	5,0
Glycine	1,2
Mannitol	20,0
Pyruvate de sodium	3,0
Chlorure de sodium	5,0
Chlorure de lithium	5,0
Tween 80	1,0
pH du milieu	6,9 ± 0,2

Milieu solide Baird Parker

Composition (g/l)	
Tryptone	10,0
Extrait de viande	5,0
Extrait autolytique de levure	1,0
Sodium pyruvate	10,0
Glycine	12,0
Lithium chlorure	5,0
Agar bactériologique	20
Emulsion de jaune d'oeuf	47 ml
Tellurite de potassium à 3,5%	3 ml
Sulfaméthazine	0,05 g/l (s'il est nécessaire d'inhiber Proteus)
pH du milieu	7,2 ± 0,2

HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES DOSAGE DU BENZO[a]PYRENE DANS LES CHARBONS ŒNOLOGIQUES PAR CLHP (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dont le benzo[a]pyrène sont extraits par l'hexane; le solvant est évaporé et le résidu est repris par le mélange méthanol-tétrahydrofuranne pour analyse en CLHP.

2. APPAREILLAGE ET REACTIFS

2.1 Réactifs et étalons

Acétonitrile pour CLHP
Hexane pour résidus de pesticides
Tétrahydrofuranne pour CLHP (THF)
Eau désionisée et microfiltrée
Benzo[a]pyrène pour HPLC.

2.2 Appareillage et conditions chromatographiques

colonne HPLC de type octadécyle
détecteur fluorimétrique réglé aux conditions de détection suivantes :
longueur d'onde d'excitation : 300 nm,
longueur d'onde d'émission : 416 nm.

Phase mobile:
solvant A: Eau désionisée et microfiltrée
solvant B : acétonitrile

variations de composition du solvant

TEMPS en mn	% solvant A	% solvant B
0	50	50
15	20	80
40	0	100
45	50	50

Débit 1,0 ml/mn

2.3 Préparation des solutions de référence

Solution mère de benzo[a]pyrène à environ 100 mg/l dans un mélange méthanol/THF (50/50) conservée 3 ans maximum au froid.

Solution fille à environ 20 µg/l, préparée extemporanément (0,5 ml de solution mère dans 50 ml de méthanol/THF puis 1 ml de cette solution intermédiaire dans 50 ml de méthanol/THF).

2.4 Préparation des échantillons

2 g de charbon œnologique sont mélangés dans un flacon conique de 50 ml avec 30 ml d'hexane

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont extraits pendant 5 min à l'aide d'un agitateur magnétique. La phase organique récupérée par filtration est recueillie dans un ballon d'évaporateur et évaporée. L'extrait est repris par 2 ml d'un mélange méthanol/THF (1/1, v/v) et injecté.

3. RESULTATS

La teneur en benzo[a]pyrène ne doit pas excéder 1 µg/kg

REMARQUE : Il est également possible de doser le benzo[a]pyrène par chromatographie en phase gazeuse en utilisant une colonne capillaire apolaire avec détection par spectrométrie de masse.

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

(Oeno 348/2010)

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.
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 $Na2HPO_4$, 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 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.
3. Garcia-Moruno E. A method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography (TLC), 2007 OIV FV 1243

INDICE DE BROME
(Oeno 18/2003)

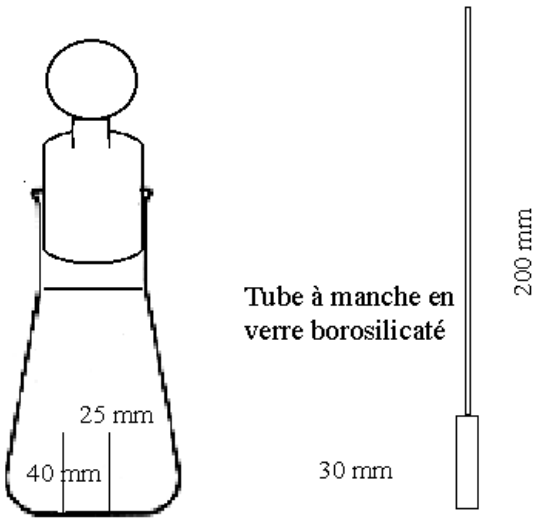
L'indice de brome est la quantité de brome, exprimée en grammes, que peuvent fixer 100 g de substance.

1. APPAREILLAGE

Une fiole jaugée de 300 à 400 ml possédant un tube intérieur soudé au fond, un bouchon émeri et un tube à manche, conformes au croquis ci-après

Fiole à bromuration de 300 ml en verre borosilicaté.
Bouchon à rodage normalisé 24/40.

Fiole à bromuration 300 ml en verre borosilicaté
Bouchon à rodage normalisé 24/40



2. SOLUTIONS

2.1 Solution 0,016 M de bromate de potassium

Cette solution contient, pour 1000 ml :

Bromate de potassium $KBrO_3$	2,783 g

Peser très exactement 2,783 g de bromate de potassium et les introduire dans une fiole jaugée de 1 000 ml contenant 500 ml environ d'eau distillée; agiter pour dissoudre et compléter à 20 °C avec de l'eau distillée le volume de 1000 ml de solution. Mélanger et conserver dans un flacon muni d'un bouchon de verre.

2.2 Solution 0,05 M d'iode

Iode I	12,69	g
Iodure de potassium KI	18	g
Eau q.s.p.	1000	ml

Peser très exactement 12,69 g d'iode, puis 18 g d'iodure de potassium et les introduire dans une fiole jaugée de 1000 ml avec 200 ml environ d'eau distillée. Laisser la dissolution s'opérer à froid, la fiole étant bouchée. Ajouter 500 ml environ d'eau distillée, agiter afin d'absorber l'iode à l'état de vapeur et compléter à 20°C avec de l'eau distillée le volume de 1 000 ml de solution. Mélanger et conserver dans un flacon de verre teinté muni d'un bouchon de verre.

2.3 Solution 0,1 M de thiosulfate de sodium

La solution 0,1 M de thiosulfate de sodium contient pour 1000 ml :

Thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3.5H_2O$	24,82 g

Peser très exactement 24,82 g de thiosulfate de sodium et les introduire dans une fiole jaugée de 1 000 ml contenant 600 ml environ d'eau distillée bouillie. Agiter pour dissoudre et compléter à 20 °C avec de l'eau distillée bouillie le volume de 1000 ml de solution. Mélanger. Conserver à l'abri de la lumière. Contrôler le titre de cette solution à l'aide de la solution 0,05 M d'iode.

3. TECHNIQUE

Disposer, à l'aide du tube à manche, environ 0,50 g d'iodure de potassium dans le récipient intérieur de la fiole ; (il est commode de faire, sur le tube, une marque circulaire correspondant à ce poids de sel, pour ne pas avoir à peser la dose à chaque dosage). Il faut prendre garde à ne pas introduire d'iodure dans la partie extérieure de la fiole. Introduire alors le volume mesuré de solution du produit à doser, dissous dans de 1'eau neutre ou alcaline, dans la partie extérieure de la fiole, puis 25 ml de solution 0,016 M de bromate de potassium mesurés avec une pipette,

et 2 g de bromure de potassium pur. Rincer les parois à 1'eau pour arriver à un volume total d'environ 100 ml, puis ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique concentré (R); fermer rapidement la fiole avec le bouchon, le rodage étant humecté d'eau distillée; par un mouvement circulaire homogénéiser le contenu et laisser reposer le temps prescrit. Agiter alors *vigoureusement* la fiole de façon à mettre en contact l'iodure de potassium avec le liquide et à permettre au brome en vapeur de réagir ; ouvrir la fiole en rinçant le rodage et le bouchon d'un jet d'eau distillée, et doser l'iode à l'aide de 25 ml de solution 0,1 M de thiosulfate de sodium; titrer l'excès de thiosulfate de sodium par la solution 0,05 M d'iode en présence d'empois d'amidon;

soit n le volume employé :

Quantité de brome (en mg) fixé par la substance à doser = $n \times 0{,}008$

DOSAGE DU CADMIUM PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Le cadmium est dosé dans les produits oenologiques solides après minéralisation par voie humide ou directement pour les produits oenologiques liquides ou mis en solution.

Les dosages sont effectués par absorption atomique sans flamme (atomisation électro-thermique dans un four graphite).

2. APPAREILLAGE

2.1 Paramètres instrumentaux (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre équipé d'un atomiseur à tube de graphite.
longueur d'onde: 228,8 nm
Lampe à cathode creuse (cadmium)
largeur de fente : 1 nm
intensité de la lampe : 3 mA
correction du fond continu par effet Zeeman
four en graphite avec une plate-forme tantalisée
(mode opératoire de la tantalisation de la plate-forme décrit ci-dessus)
réglages du four pour une analyse :

étape	température (°C)	durée (s)	débit de gaz (l / mn)	type de gaz	lecture du signal
1	100	35	3,0	argon	non
2	500	10	3,0	argon	non
3	500	45	1,5	argon	non
4	500	1	0,0	argon	non
5	2250	1	0,0	argon	oui
6	2250	1	0,0	argon	oui
7	2500	2	1,5	argon	non
8	1250	10	3,0	argon	non
9	75	10	3,0	argon	non

2.2 Réglages de l'échantillonneur automatique (donnés à titre d'exemple)

	volumes injectés en µl		
	solution de Cd à 8 µg/l	blanc	modificateur de matrice
blanc	0	10	2
étalon N° 1 à 8 µg / l	1	9	2
étalon N° 2 à 16 µg / l	2	8	2
étalon N° 3 à 24 µg / l	3	7	2
étalon N° 4 à 32 µg / l	4	6	2
échantillon à doser	5	5	2

3. RÉACTIFS

Eau déminéralisée

Acide nitrique pur pour analyse à 65 %

Chlorure de palladium anhydre (59 % en Pd)

Nitrate de magnésium à 6 molécules d'eau (ultra pur)

Dihydrogénophosphate d'ammonium

Modificateur de matrice : mélange de chlorure de palladium et de nitrate de magnésium (dissoudre 0,25 g de $PdCl_2$ et 0,1 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ dans 50 ml d'eau déminéralisée) ou dihydrogénophosphate d'ammonium à 6% (dissoudre 3 g de $NH_4H_2PO_4$ dans 50 ml d'eau déminéralisée).

Solution mère de cadmium à 1g/l, commerciale ou préparée de la manière suivante : dissoudre 2,7444 g $Cd(NO_3)_2.4H_2O$ dans une solution de HNO_3 0,5 M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M.

Solution de cadmium à 10 mg/l : placer 1 ml de la solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 5 ml d'acide nitrique pur et compléter au volume avec de l'eau déminéralisée

Solution de cadmium à 0,8 g/l : placer 4 ml de la solution diluée dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter 2,5 ml d'acide nitrique pur et compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Gamme d'étalonnage à 0, 8, 16, 24 et 32 µg/l de cadmium.

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Aucune préparation n'est nécessaire pour les produits œnologiques liquides ou sous forme de solutions, les produits solides étant minéralisés par voie humide

Le blanc est constitué par une solution d'acide nitrique pur pour analyse à 1 %.

5. MODE OPERATOIRE

Chaque solution d'étalonnage est passée aussitôt après le blanc, faire 2 lectures successives d'absorbance et établir la courbe de calibration.

Calculer les teneurs en cadmium des échantillons en tenant compte de la prise d'essai des différentes dilutions.

DOSAGE DU CALCIUM PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Le calcium est dosé directement dans le produit œnologique liquide (ou dans la solution de minéralisation) convenablement dilué par spectrométrie d'absorption atomique en flamme air-acétyléne, après addition d'un tampon spectral.

2. APPAREILLAGE

Paramètres instrumentaux (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique
flamme air-acétylène réductrice
Lampe à cathode creuse (calcium)
longueur d'onde: 422,7 nm
largeur de fente: 0,2 nm
intensité de la lampe : 5 mA
Pas de correction d'absorption non spécifique.

3. RÉACTIFS

3.1 eau déminéralisée

3.2 solution mère de calcium à 1 g/l, commerciale ou préparée de la manière suivante : dissoudre 5,8919 g de $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ dans une solution de HNO_3 0,5 M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M.

3.3 solution de calcium à 100 mg/l :

placer 10 ml de la solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml et 1 ml d'acide nitrique pur.

compléter au volume avec de l'eau déminéralisée

3.4 acide chlorhydrique concentré (R): 35 % minimum

3.5 solution de lanthane à 25 g/l :

peser 65,9 g de chlorure de lanthane ($LaCl_3.6H_2O$) dans un vase cylindrique de 250 ml, transvaser dans une fiole jaugée de 1000 ml avec de l'eau déminéralisée; ajouter à l'éprouvette 50 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) ; après solubilisation, laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

3.6 gamme d'étalonnage: 0, 2, 4, 6, 8 mg/l de calcium

placer successivement 0, 1,0, 2,0, 3,0 et 4,0 ml de la solution à 100 mg/l de calcium dans 5 fioles jaugées de 50 ml, ajouter 10 ml de la solution de lanthane à 25 g/l, compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

4.1 Cas des produits œnologiques liquides ou en solution

Dans une fiole jaugée de 50 ml placer 10 ml de la solution de lanthane et un volume d'échantillon tel qu'après avoir complété au volume avec de l'eau déminéralisée la concentration soit inférieure à 8 mg/l.

4.2 Cas des produits œnologiques sous forme solide

Procéder à une minéralisation par voie sèche ;

mettre dans chaque solution de la gamme la même quantité d'acide utilisé pour la mise en solution des cendres ou la minéralisation (voir le chapitre « Minéralisation »).

Reprendre les cendres par 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (35 % minimum), dans une fiole de 100 ml ; ajouter 20 ml de la solution de lanthane à 25 g/l et compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Réaliser un blanc dans les mêmes conditions.

5. MODE OPERATOIRE

Passer chaque solution de la gamme par ordre croissant de la concentration en calcium.

Faire pour chaque solution 2 lectures d'absorbance lorsqu'elles sont parfaitement stabilisées (temps d'intégration du signal : 10 secondes).

Passer 2 fois chaque échantillon, et calculer les teneurs en calcium.

RECHERCHE DES CHLORURES
(Oeno 18/2003)

Dans un tube à essais de 160 × 16 mm, placer le volume prescrit de solution obtenue par le moyen indiqué dans chaque monographie ; ajouter 5 ml d'acide nitrique dilué (R); compléter à 20 ml et ajouter 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R).

Comparer l'opalescence ou le trouble éventuel à celui du témoin préparé avec 0,5 ml d'acide chlorhydrique à 0,10 g par litre (soit 0,05 mg de HCl) additionné de 5 ml d'acide nitrique dilué (R), et ajuster à 20 ml avec de l'eau distillée. Ajouter 0,5 ml de solution de nitrate d'argent à 5 p. 100 (R). Ce tube contient 50 µg de HCl.

DOSAGE DU CHROME PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

le chrome est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme

APPAREILLAGE

2.1 Paramètres expérimentaux (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique
longueur d'onde: 357,9 nm
Lampe à cathode creuse (Chrome)
largeur de fente: 0,2 nm
intensité de la lampe: 7 mA
correction du fond continu par effet Zeeman
introduction à chaud des échantillons dans le four graphite
mesure du signal : en hauteur de pic
durée de la mesure: 1 seconde
nombre de mesures par échantillon: 2
tube de graphite pyrolytique:
four en graphite pyrolytique contenant une plate-forme de L'Vov tantalisée
tantalisation de la plate-forme (voir ci-dessus)
gaz inertes : mélange argon - hydrogène (95% ; 5 %)
paramètres du four:

étape	température (° C)	durée (s)	débit du gaz (l / mn)	type de gaz	lecture du signal
1	85	5	3,0	argon + hydrogène	non
2	95	40	3,0	argon + hydrogène	non
3	120	10	3,0	argon + hydrogène	non
4	1000	5	3,0	argon + hydrogène	non
5	1000	1	3,0	argon + hydrogène	non
6	1000	2	0,0	argon + hydrogène	non
7	2600	1,2	0,0	argon + hydrogène	oui
8	2600	2	0,0	argon + hydrogène	oui
9	2600	2	3,0	argon + hydrogène	non
10	75	11	3,0	argon + hydrogène	non

2.2 Réglages de l'échantillonneur automatique

(donnés à titre d'exemple)

	volumes injectés en µl		
	solution de chrome à 50 µg/l	blanc	modificateur de matrice
blanc	0	17	3
étalon N° 1 à 50 µg/l	5	12	3
étalon N° 2 à 100 µg/l	10	7	3
étalon N° 3 à 150 µg/l	15	2	3
échantillon à doser	5	12	3

3. RÉACTIFS

3.1 eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 acide nitrique pur pour analyse à 65 %

3.3 chlorure de palladium anhydre (59 % en Pd)

3.4 nitrate de magnésium hexahydraté pur pour analyse

3.5 Dihydrogénophosphate d'ammonium

3.6 Modificateur de matrice : mélange de chlorure de palladium et de nitrate de magnésium (dissoudre 0,25 g de $PdCl_2$ et 0,1 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ dans 50 ml d'eau déminéralisée) dihydrogénophosphate d'ammonium à 6% (dissoudre 3 g de $NH_4H_2PO_4$ dans 50 ml d'eau déminéralisée).

3.7 agent réducteur : acide L-ascorbique en solution à 1 % m/v.

3.8 solution mère de chrome à 1 g/l, commerciale ou préparée de la manière suivante : dissoudre 7,6952 g de $Cr(NO_3)_3.9H_2O$ dans une solution de HNO_3 0,5 M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M

3.9 solution de chrome à 10 mg/l : placer 1 ml de solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 5 ml d'acide nitrique à 65 % et compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

3.10 gamme d'étalonnage : 0, 50, 100 et 150 µg/l de chrome (voir tableau: réglages de l'échantillonneur automatique).

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

4.1 Cas des produits oenologiques liquides ou en solution

Les préparations sont effectuées manuellement ou automatiquement par le diluteur en suivant les données du tableau «réglages de l'échantillonneur automatique ».

4.2 Cas des produits oenologiques sous forme solide

Procéder à une minéralisation par voie humide. Faire un blanc.

5. MODE OPERATOIRE

Passer chaque solution de la gamme par ordre croissant de la concentration en chrome;

passer 2 fois chaque échantillon, et calculer les teneurs en chrome en tenant compte de la prise d'essai.

CENDRES SULFURIQUES
(Oeno 18/2003)

Les cendres sulfuriques résultent de la calcination au contact de l'air après attaque par l'acide sulfurique.

Porter au rouge un creuset de silice ou de platine de forme basse pendant 30 mn, laisser refroidir dans un dessiccateur à vide et tarer le creuset. Placer la prise d'essai exactement pesée dans le creuset et la mouiller avec la quantité suffisante d'acide sulfurique (R) concentré préalablement dilué par un égal volume d'eau. Chauffer jusqu'à évaporation à sec, puis au four à moufle, d'abord avec précaution puis jusqu'au rouge sans dépasser la température de 600 °C ± 25 °C. Maintenir la calcination jusqu'à disparition des particules noires, laisser refroidir, ajouter au résidu 5 gouttes d'acide sulfurique dilué au demi, puis évaporer et calciner comme précédemment jusqu'à poids constant, peser après refroidissement dans le dessiccateur.

Calculer le taux des cendres sulfuriques en les rapportant à 100 g de substance.

CENDRES TOTALES

Les cendres totales résultent de la calcination du produit au contact de l'air.

Porter au rouge un creuset de silice ou de platine de forme basse. Pendant 30 mn laisser refroidir dans un dessiccateur à vide et tarer le creuset. Disposer de façon homogène la prise d'essai exactement pesée dans le creuset. Dessécher pendant une heure à l'étuve à 100-105 °C. Incinérer au four à moufle, d'abord avec précaution pour éviter que l'échantillon ne s'enflamme, puis jusqu'au rouge à une température de 600 ± 25 °C. Maintenir la calcination jusqu'à disparition des particules noires. Pendant 30 mn laisser refroidir dans un dessiccateur à vide. Peser. Continuer la calcination jusqu'à masse constante.

Si des particules noires persistent reprenez les cendres à l'eau distillée chaude. Filtrer ces cendres sur un filtre sans cendres (porosité 10 µm). Incinérer le filtre et le résidu jusqu'à masse constante. Réunir les nouvelles cendres avec le filtrat. Evaporer l'eau. Incinérer le résidu jusqu'à masse constante.

Calculer le taux des cendres totales en les rapportant à 100 g de substance.

DOSAGE DU CUIVRE PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Le cuivre est dosé par spectrométrie d'absorption atomique en flamme en utilisant la méthode des ajouts dosés.

APPAREILLAGE

Paramètres instrumentaux: (donnés à titre d'exemple)
Spectrophotomètre d'absorption atomique
flamme: air-acétylène oxydante
longueur d'onde: 324,7 nm
lampe à cathode creuse (cuivre)
largeur de fente: 0,5 nm
intensité de la lampe: 3,5 mA
pas de correction d'absorption non spécifique.

3. RÉACTIFS

3.1 eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 acide nitrique pur pour analyse à 65 %

3.3 solution mère de cuivre à 1 g/l, commerciale ou préparée de la manière suivante : dissoudre 3,8023 g de $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ dans une solution de HNO_3 0,5M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5M.

3.4 solution de cuivre à 10 mg/l : placer 2 ml de la solution mère de cuivre dans une fiole jaugée de 200 ml, ajouter 2 ml d'acide nitrique à 65 % et compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Régler l'appareil à l'aide d'une solution étalon à 0,4 mg/l (2 ml de la solution de cuivre à 10 mg/l dans une fiole jaugée de 50 ml, compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse).

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS (MÉTHODE DES AJOUTS DOSES)

- Ajout de 0,2 mg/l de cuivre :
  placer 5 ml de produit œnologique liquide ou de minéralisat de produit œnologique obtenu par voie sèche dans un flacon et ajouter 100 µl de la solution de cuivre à 10 mg/l ;
- Ajout de 0,4 mg/l de cuivre :

placer 5 ml de produit œnologique liquide ou de minéralisat dans un flacon et ajouter 200 µl de la solution de cuivre à 10 mg/l

- dilution de l'échantillon

Dilution de l'échantillon : la dilution n'est nécessaire que si sa teneur en cuivre est supérieure à 0,5 mg/l de cuivre.

5. MODE OPERATOIRE

Pour chaque échantillon passer dans l'ordre :

- le blanc (eau déminéralisée)
- l'échantillon additionné de 0,2 mg/l de cuivre
- l'échantillon additionné de 0,4 mg/l de cuivre
- l'échantillon sans addition

les résultats sont obtenus automatiquement ou par graphe manuel.

ANALYSES DE CONTROLE DES GAZ PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Les gaz sont contrôlés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'une colonne de type "tamis moléculaire" et détection par catharomètre ou ionisation de flamme.

2. PRÉLÈVEMENT

Utiliser au choix

- un flacon en acier inoxydable d'échantillonnage pour gaz
- un sac d'échantillonnage pour gaz en téflon.

3. MODE D'INJECTION

Utilisation d'une vanne à gaz non chauffée équipée d'une boucle de 250 µl.

4. SÉPARATION DES GAZ LÉGERS, H_2, O_2, N_2, CO, CH_4.

4.1 Colonne (à titre d'exemple)

Phase : Tamis moléculaire Chromosorb 101, Porapak Q
diamètre des particules: 5 µm
granulométrie: 80 à 100 mesh

Dimensions : Longueur: 2 m, diamètre intérieur : 2 mm.

4.2 Gaz vecteur

Helium (He), débit : 3 ml/mn

4.3 Température du four : 40 °C isotherme

4.4 Détecteur: Catharomètre, Intensité 190 µA

5. SÉPARATION DES HYDROCARBURES LÉGERS

5.1 Colonne (à titre d'exemple)

Type macrobore

Phase : apolaire, diamètre des particules : 5 µm

Longueur: 30 m, diamètre intérieur: 0,53 mm

5.2 Gaz vecteur

Nature : Helium , Débit : 3 ml/mn

Température du four 35 à 200 °C montée: 10 °C/mn

5.3 Détecteur : Ionisation de flamme, température 220 °C.

RECHERCHE DES METAUX LOURDS (Oeno 18/2003)

1. Principe de la méthode

Les métaux lourds réagissent avec la fonction thiol pour former des sulfures. La coloration qui en résulte est comparée à un standard.

2. Réactifs

2.1 Acétate d'ammonium,
2.2 Nitrate de plomb(II),
2.3 Glycérol,
2.4 Méthanol,
2.5 Hydroxyde de sodium, solution à 1 mole NaOH /l,
2.6 Acide chlorhydrique à 37 %,
2.7 Réactif au thioacétamide (R):
2.8 Solution standard de plomb :

2.8.1 Solution de plomb à 1000 µg/ml : dissoudre 1,598 g de nitrate de plomb(II) dans l'eau et compléter à 1000 ml.

2.8.2 Solution de plomb à 10 µg/ml. Diluer 10 ml de la solution 2.8.1 à 1000 ml avec de l'eau distillée. A préparer juste avant utilisation.

2.9 Solution tampon, pH = 3,5 : dissoudre 6,25 g d'acétate d'ammonium (2.1) dans 6 ml d'eau, ajouter 6,4 ml d'acide chlorhydrique (2.6) et diluer à l'eau jusqu'à 25 ml.

3. MODE OPERATOIRE

3.1 Solution test : verser dans une fiole jaugée de 50 ml, 5 ml de solution tampon (2.9), puis 25,0 g d'échantillon et environ 15 ml d'eau. Compléter avec de l'eau jusqu'au repère.

3.2 Solutions colorées :

3.2.1 Solution échantillon : mélanger dans un tube à essai 12,0 ml de solution test (3.1) et 2,0 ml de solution tampon (2.9)

3.2.2 Solution comparative : mélanger dans un tube à essai 2,0 ml de solution test (3.1), 2,0 ml de solution tampon (2.9), 0,5 ml de solution standard de plomb (2.8.2), 4,5 ml d'eau et 5,0 ml de méthanol.

3.2.3 Solution de contrôle : mélanger dans un tube à essai 12,0 ml de solution test (3.1), 2,0 ml de solution tampon (2.9) et 0,5 ml de solution standard de plomb (2.8.2)

3.2.4 Comparaison des colorations :

ajouter 1,2 ml du réactif de thioacétamide (2.7) dans les 3 tubes à essai (3.2.1 à 3), mélanger et attendre 2 minutes. Comparer la coloration en vision verticale à la lumière du jour.

la solution échantillon ne doit pas être plus sombre que la solution comparative.

la solution de contrôle ne doit pas être plus claire que la solution comparative

4. Résultats :

Les conditions décrites en 3.2.4 sont obtenues si la teneur en métaux lourds est inférieure à 10 mg/l exprimée en plomb et avec une précision de 1 mg/l .

DOSAGE DU FER PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

le fer est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme

2. APPAREILLAGE

2.1 Paramètres instrumentaux: (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique
flamme: air-acétylène oxydante
lampe à cathode creuse (fer)
longueur d'onde : 248,3 nm
largeur de fente : 0,2 nm
intensité de la lampe : 5 mA
pas de correction d'absorption non spécifique.

3. RÉACTIFS

3.1 eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 solution de fer à 1 g/l, commerciale ou préparée de la manière suivante : dissoudre 7,2336 g de $Fe(NO_3)_2,9H_2O$ dans une solution de HNO3 0,5 M ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M.

3.3 solution de fer à 100 mg/l

placer 10 ml de la solution mère de fer dans une fiole jaugée de 100 ml, compléter avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse

3.4 gamme d'étalonnage : 2, 4, 6, 8 mg/l de fer

placer successivement 1,0, 2,0, 3,0 et 4,0 ml de la solution à 100 mg/l de fer dans 4 fioles jaugées de 50 ml; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse

réaliser un blanc sans fer dans les mêmes conditions.

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

4.1 Cas des produits oenologiques liquides ou en solution

chaque échantillon est dilué avec de l'eau déminéralisée, afin d'avoir une concentration en fer comprise entre 0 et 8 mg/l.

4.2 Cas des produits oenologiques sous forme solide

procéder à une minéralisation par voie sèche.

mettre dans chaque solution de la gamme étalon la même quantité d'acide utilisé pour la mise en solution des cendres ; chaque échantillon est dilué avec de l'eau déminéralisée, afin d'avoir une concentration en fer comprise entre 0 et 8 mg/l.

5. MODE OPERATOIRE

Passer successivement les solutions d'étalonnage et le blanc qui sera de l'eau déminéralisée ou une solution eau-acide aux concentrations utilisées pour les échantillons de produits oenologiques solides minéralisés par voie sèche et éventuellement diluer.

DOSAGE DU PLOMB PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Après minéralisation de l'échantillon en milieu acide, le plomb est dosé par spectrométrie sans flamme (atomisation électro-thermique).

2. APPAREILLAGE

2.1 Paramètres instrumentaux : (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un atomiseur à tube de graphite

longueur d'onde: 283,3 nm
lampe à cathode creuse (plomb)
largeur de fente : 0,5 nm
intensité de lampe : 5 mA
correction du fond continu: par effet Zeeman
introduction à chaud des échantillons dans le four graphite par un distributeur automatique (l'eau de rinçage contient 2 gouttes de Triton par litre)
mesure du signal : hauteur de pic
durée de la mesure : 1 seconde
nombre de mesures par échantillon: 2

tube de graphite pyrolytique

four en graphite pyrolytique contenant une plate-forme de L'Vov tantalisée

(tantalisation d'une plate-forme: voir ci-dessus).
paramètres du four

température (° C)	durée (s)	débit du gaz (l / mn)	type de gaz	lecture du signal
150	20,0	3,0	argon	non
150	35,0	3,0	argon	non
800	15,0	3,0	argon	non
800	30,0	3,0	argon	non
800	2,0	0,0	argon	non
2250	0,8	0,0	argon	oui
2250	1,0	0,0	argon	oui
2500	1,0	1,5	argon	non
1200	9,0	3,0	argon	non
75	10,0	3,0	argon	non

2.2 Réglages de l'échantillonneur automatique (donnés à titre d'exemple)

	volumes injectés en µl		
	solution de plomb à 50 µg / l	blanc	modificateur de matrice
blanc	0	10	2
étalon N° 1	1	9	2
étalon N° 2	2	8	2
étalon N° 3	3	7	2
étalon N° 4	4	6	2
étalon N° 5	6	4	2
échantillon à doser	10	0	2

3. RÉACTIFS

3.1 Eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 Acide nitrique pur pour analyse à 65 %

3.3 Dihydrogénophosphate d'ammonium

3.4 Modificateur de matrice : dihydrogénophosphate d'ammonium à 6 %.

Introduire 3 g de dihydrogénophosphate d'ammonium dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre et compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Solution mère de plomb à 1 g/l du commerce ou préparée de la manière suivante : dissoudre 1,5985 g de $Pb(NO_3)_2$ pur pour analyse dans une solution de HNO_3 0,5 M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M.

Solution de plomb à 10 mg / l :placer 1 ml de la solution mère de plomb à 1 g/l dans une fiole jaugée de 100 ml ; ajouter 1 ml d'acide nitrique à 65 % compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

Solution de plomb à 0,1 mg/l : placer 1 ml de la solution de plomb à 10 mg/l dans une fiole jaugée de 100 ml,

ajouter 1 ml d'acide nitrique à 65 %; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

Gamme d'étalonnage: 0, 50, 100, 150, 200, 300, µg/l de plomb

Le cycle du distributeur automatique permet d'injecter directement ces quantités de plomb sur la plate-forme à partir de la solution de plomb à 0,050 mg/l.

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons liquides ou en solution doivent avoir des concentrations comprises entre 0 et 300 µg/l de plomb.

Les échantillons solides seront minéralisés par voie humide (attaque à l'acide nitrique).

Le blanc est constitué par de l'eau pure pour analyse contenant 1 % d'acide nitrique à 65 %.

5. MODE OPERATOIRE

La courbe d'étalonnage représentant les variations des absorbances en fonction des concentrations permet de calculer les teneurs en plomb des échantillons.

DOSAGE DU MERCURE PAR GENERATION DE VAPEUR ET SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode s'applique à l'analyse du mercure dans les produits oenologiques dans la gamme de concentration de 0 à 10 µg/l.

2. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

2.1. Principe de la méthode

2.1.1. Minéralisation par voie humide du produit œnologique à analyser.

2.1.2. Réduction du permanganate non consommé par du chlorhydrate d'hydroxylamine.

2.1.3. Réduction du mercure(II) en mercure métal par du chlorure d'étain(II) (chlorure stanneux).

2.1.4. Entraînement du mercure par un courant d'argon, à température ambiante.

Dosage du mercure à l'état de vapeur monoatomique par spectrométrie de fluorescence atomique, à la longueur d'onde de 254 nm : les atomes de mercure sont excités par une lampe à vapeur de mercure ; les atomes ainsi excités réémettent une radiation dite de fluorescence qui permet de quantifier le mercure présent à l'aide d'un détecteur photonique placé à 90° par rapport au faisceau d'excitation ; la détection par fluorescence atomique permet d'obtenir une bonne linéarité et élimine les effets de mémoire.

2.2. Principe de l'analyse (figure n°1)

La pompe péristaltique aspire la solution de chlorure d'étain(II), le blanc (eau déminéralisée contenant 1 % d'acide nitrique) et l'étalon ou l'échantillon minéralisé.

Le mercure métal est entraîné, dans le séparateur gaz-liquide, par un courant d'argon.

Après passage dans la gaine d'un desséchant, le mercure est détecté par fluorescence.

Puis, le courant gazeux passe dans une solution de permanganate de potassium afin de piéger le mercure.

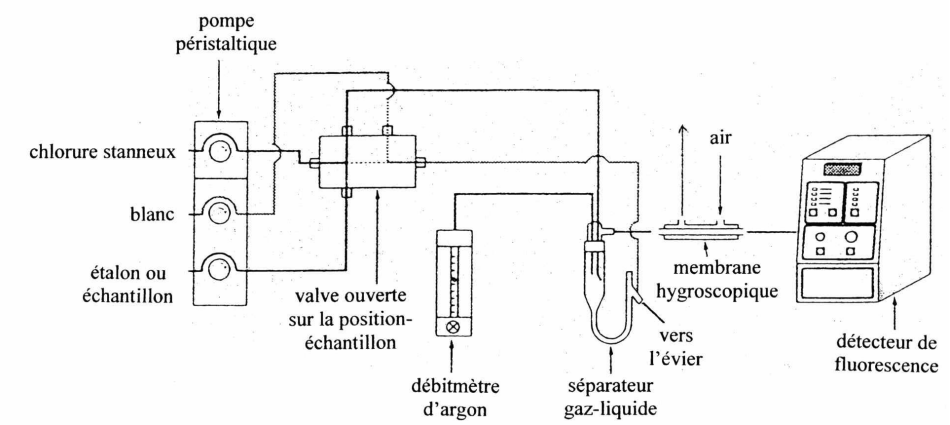


Figure n°1. Chaîne analytique pour doser le mercure

3. REACTIFS ET PREPARATION DES SOLUTIONS REACTIVES

3.1. Eau déminéralisée ultra-pure

3.2. Acide nitrique ultra-pur à 65 %

3.3. Blanc : eau déminéralisée (3.1) contenant 1 % d'acide nitrique (3.2)

3.4. Solution d'acide nitrique 5,6 M : introduire 400 ml d'acide nitrique (3.2) dans une fiole de 1000 ml ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

3.5. Acide sulfurique (d = 1,84)

3.6. Solution d'acide sulfurique 9 M : introduire 200 ml d'eau déminéralisée (3.1) dans une fiole de 1000 ml, puis 500 ml d'acide sulfurique (3.5) ; après refroidissement, compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

3.7. Permanganate de potassium $KMnO_4$

3.8. Solution de permanganate de potassium à 5 % : dissoudre, avec de l'eau déminéralisée (3.1.), 50 g de permanganate de potassium (3.7) dans une fiole de 1000 ml ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

3.9. Chlorhydrate d'hydroxylamine NH_2OH,HCl

3.10. Solution réductrice : peser 12 g de chlorhydrate d'hydroxylamine (3.9) et les dissoudre dans 100 ml d'eau déminéralisée (3.1).

3.11. Chlorure d'étain II ($SnCl_2$,2 H_2O)

3.12. Acide chlorhydrique concentré

3.13. Solution de chlorure d'étain (II) : peser 40 g de chlorure d'étain (3.11) et les dissoudre dans 50 ml d'acide chlorhydrique (3.12) ; compléter à 200 ml avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

3.14 Solution mère de mercure à 1 g/l préparée par dissolution de 1,708 g de $Hg(NO3)2.H_2O$, dans 1 l de solution de HNO_3 à 12 % (m/m).

3.15. Solution-étalon de mercure à 10 mg/l, contenant 5 % d'acide nitrique et préparée à partir de la solution mère à 1 g/l (3.14).

3.16. Solution de mercure à 50 µg/l : placer 1 ml de la solution à 10 mg/l (3.14.) dans une fiole de 200 ml ; ajouter 2 ml d'acide nitrique (3.2) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

4. APPAREILLAGE

4.1. Verrerie :

4.1.1. fioles jaugées de 100, 200 et 1000 ml (classe A)

4.1.2. pipettes jaugées de 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 5 ; 10 et 20 ml (classe A)

4.1.3. précautions : Avant toute utilisation, la verrerie doit être lavée avec de l'acide nitrique à 10 %, laissée en contact pendant 24 heures, puis rincée avec de l'eau déminéralisée.

4.2. Appareil de minéralisation (voir Recueil des méthodes internationales

d'analyse des vins et des moûts)

4.3. Chauffe-ballon thermostaté

4.4. Pompe péristaltique

4.5. Générateur de vapeur froide

4.5.1. séparateur gaz-liquide

4.6. Desséchant (membrane hygroscopique) parcouru par un courant d'air (fourni par un compresseur) et placé avant le détecteur

4.7. Spectrofluorimètre :

4.7.1. lampe à vapeur de mercure, réglée à la longueur d'onde de 254 nm

4.7.2. détecteur spécifique de fluorescence atomique

4.8. Micro-ordinateur :

4.8.1. logiciel réglant les paramètres du générateur de vapeur et du détecteur de fluorescence atomique et permettant l'étalonnage et l'exploitation des résultats.

4.8.2. imprimante archivant les résultats

4.9. Bouteille de gaz neutre (argon)

5. PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE ET DES ECHANTILLONS

5.1. Gamme d'étalonnage : 0 ; 0,25 ; 0,5 et 1,0 µg/l

Introduire 0 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ml de la solution de mercure à 50 µg/l (3.15) dans 4 fioles de 100 ml ; ajouter 1 % d'acide nitrique (3.2) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

5.2. Echantillons

Minéraliser les échantillons par voie humide. La prise d'essai est introduite dans le ballon à fond rond en verre borosilicaté, posé sur un disque percé d'un trou et dont le col est tenu incliné.

Ajouter 5 ml d'acide sulfurique concentré (R) et 10 ml d'acide nitrique concentré (R) et chauffer progressivement. Lorsque le mélange tend à brunir, ajouter une petite quantité d'acide nitrique en continuant à chauffer et ainsi de suite jusqu'à ce que le liquide reste incolore et que l'atmosphère du ballon se remplisse de fumées blanches de SO_3. Laisser refroidir, reprendre par 10 ml d'eau distillée et chauffer à nouveau pour chasser les vapeurs nitreuses jusqu'au dégagement de fumées blanches. Cette opération est recommencée une deuxième fois; après une troisième reprise, faire bouillir un instant, refroidir, stabiliser par quelques gouttes (10 environ) de permanganate de potassium (sol. aqueuse) à 5 p. 100 (m/m) et porter le liquide à 40 ml avec de l'eau.

Les filtrer sur filtres sans cendres. Introduire 10 ml de filtrat dans une fiole de 50 ml. Ajouter du permanganate de potassium (3.8.) jusqu'à persistance de la coloration. Solubiliser le précipité (MnO_2) avec la solution réductrice (3.10). Compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1).

Faire un essai à blanc sur de l'eau déminéralisée.

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Détermination analytique

Allumer le fluorimètre ; l'appareil est stabilisé au bout de 15 minutes.

La pompe péristaltique aspire le blanc (3.3.), la solution de chlorure d'étain(II) (3.13) et les étalons ou les échantillons (5.1) ou (5.2).

Vérifier qu'il se produit un bullage dans le séparateur gaz-liquide.

Présenter successivement les solutions d'étalonnage (5.1); déclencher la programmation du générateur de vapeur. Le logiciel de l'ordinateur établit la courbe d'étalonnage (pourcentage de fluorescence en fonction de la concentration en mercure en µg/l).

Présenter ensuite les échantillons (5.2).

6.2. Autocontrôles

Toutes les cinq déterminations, un blanc analytique et un étalon sont analysés afin de corriger une éventuelle dérive du spectrofluorimètre.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont donnés par le logiciel de l'ordinateur et exprimés en ppb. (ou µg/l).

La concentration en mercure dans les produits œnologiques est calculée en fonction de la prise d'essai et de la dilution du minéralisat, elle est exprimée en µg/kg.

8. CONTROLE DES RESULTATS

Le contrôle qualité est effectué en plaçant, après la gamme d'étalonnage et tous les cinq échantillons, un matériau de référence dont on connaît avec certitude la teneur en mercure.

Une carte de contrôle est établie pour chaque matériau de référence utilisé. Les limites de contrôle ont été fixées à : +/- $2S_R$ intra (S_R intra : écart-type de reproductibilité).

10 – **BIBLIOGRAPHIE**

10.1. CAYROL M., BRUN S., 1975. Dosage du mercure dans les vins. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°371.

10.2. REVUELTA D., GOMEZ R., BARDON A., 1976. Dosage du mercure dans le vin par la méthode des vapeurs froides et spectrométrie d'absorption atomique. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°494.

10.3. CACHO J., CASTELLS J.E., 1989. Determination of mercury in wine by flameless atomic absorption spectrophotometry. Atomic Spectroscopy, vol. 10, n°3.

10.4. STOCKWELL P.B., CORNS W.T., 1993. The role of atomic fluorescence spectrometry in the automatic environmental monitoring of trace element analysis. Journal of Automatic Chemistry, vol. 15, n°3, p 79-84.

10.5. SANJUAN J., COSSA D., 1993. Dosage automatique du mercure total dans les organismes marins par fluorescence atomique. IFREMER, Rapport d'activité.

10.6. AFNOR, 1997. Dosage du mercure total dans les eaux par spectrométrie de fluorescence atomique. XPT 90-113-2.

10.7. GAYE J., MEDINA B., 1998. Dosage du mercure dans le vin par analyse en flux continu et spectrofluorimétrie. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°1070.

MÉTHODES DE MINÉRALISATION DES ECHANTILLONS AVANT DOSAGE PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. MINÉRALISATION PAR VOIE SÈCHE

Méthode applicable pour doser les éléments suivants: calcium, magnésium, sodium, fer, cuivre, zinc

1.1 Obtention des cendres

Peser avec précision, 5 g de produit oenologique (ou 1g dans le cas des produits riches en matières minérales), dans une capsule de platine ou de silice préalablement nettoyée et tarée

Brûler doucement l'échantillon sur la flamme d'un bec Bunsen, sous une hotte aspirante .

Mettre la capsule dans un four à moufle à 525 °C ± 25 °C pendant 12 heures.

Reprendre le résidu avec quelques ml d'eau déminéralisée.

Évaporer l'eau sur un bain d'eau à 100 °C.

Replacer la capsule contenant l'échantillon dans le four.

La minéralisation est terminée quand les cendres sont blanches.

1.2 Mise en solution des cendres

Les cendres sont solubilisées par 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) amener le volume à 100 ml avec de l'eau déminéralisée

Dilutions complémentaires:

Rediluer la solution de cendres dans l'acide chlorhydrique, de façon à être compatible avec la sensibilité de l'appareil ; voir séparément la méthode propre à chaque cation.

Pour le dosage du calcium et du magnésium, ajouter du chlorure de lanthane au cours de cette dilution.

Réaliser un blanc.

2. MINÉRALISATION PAR VOIE HUMIDE

Méthode applicable pour doser les éléments suivants : arsenic, cadmium, plomb, dans les produits oenologiques contenant de l'eau

2.1 Cas des produits aqueux

Peser avec précision, dans un tube de polypropylène de 50 ml, 3 grammes de produit oenologique pulvérisé, ajouter 5 ml d'acide nitrique à 65 % ; fermer avec le bouchon à vis ; laisser 12 heures à température ambiante puis, après avoir dévissé le bouchon, placer le tube dans un bain d'eau à 90 °C pendant 3 heures, sous une hotte aspirante; laisser refroidir; ajuster le volume à 20 ml avec de l'eau déminéralisée; agiter; filtrer sur filtre sans cendres (si nécessaire).
Réaliser le blanc dans les mêmes conditions .

2.2 Cas des produits secs

La minéralisation est semblable à celle des produits aqueux, mais en utilisant une prise d'essai de 0,5 gramme de produit oenologique.

DOSAGE DU NICKEL

PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Le nickel est dosé directement par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme (atomisation électro-thermique).

2. APPAREILLAGE

2.1 Paramètres instrumentaux : (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un atomiseur à tube de graphite.

longueur d'onde : 232,0 nm
lampe à cathode creuse (nickel)
largeur de la fente : 0,2 nm
intensité de la lampe : 4 mA
correction du fond continu par effet Zeeman
introduction à chaud des échantillons dans le four-graphite avec un distributeur automatique
l'eau de rinçage contient 2 gouttes de Triton par litre.
mesure du signal : en hauteur de pic.
durée de la mesure : 1 seconde.
Tube de graphite pyrolytique :
four en graphite pyrolytique contenant une plateforme de L'Vov tantalisée.
tantalisation d'une plateforme : voir ci-dessus.
gaz inertes : argon et mélange argon + hydrogène (95% : 5%).

paramètres du four :

Paramètres du four pour le dosage du nickel

étape n°	température (°C)	durée (s)	débit du gaz (l/mn)	type de gaz	lecture du signal
1	85	5,0	3,0	argon	non
2	95	40,0	3,0	argon	non
3	120	10,0	3,0	argon	non
4	800	5,0	3,0	argon	non
5	800	1,0	3,0	argon	non
6	800	2,0	0	argon	non
7	2 400	1,1	0	argon + hydrogène	oui
8	2 400	2,0	0	argon + hydrogène	oui
9	2 400	2,0	3,0	argon	non
10	75	11,0	3,0	argon	non

2.2 Réglage de l'échantillonneur automatique (donnés à titre d'exemple)

- Paramètres de l'échantillonneur automatique

	volume injecté en µl		
	solution de Ni à 50 µg/l	blanc	modificateur de matrice
blanc		17	3
étalon 1	5	12	3
étalon 2	10	7	3
étalon 3	15	2	3
échantillon	5	12	3

3. REACTIFS

3.1 Eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 Acide nitrique pur pour analyse à 65 %

3.3 Chlorure de palladium anhydre (59 % en Pd)

3.4 Nitrate de magnésium hexahydraté pur pour analyse.

3.5 Dihydrogénophosphate d'ammonium

3.6 Modificateur de matrice : mélange de chlorure de palladium et de nitrate de magnésium (dissoudre 0,25 g de $PdCl_2$ et 0,1 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ (3.4)

dans 50 ml d'eau déminéralisée) ou dihydrogénophosphate d'ammonium à 6% (dissoudre 3 g de $NH_4H_2PO_4$ dans 50 ml d'eau déminéralisée). (3.1).

3.7 Acide L-ascorbique.

3.8 Blanc analytique : solution d'acide L-ascorbique à 1 % (m/v).

3.9 Solution-mère de nickel à 1 g/l (1000 µg/ml) du commerce ou préparée de la manière suivante : dissoudre 4,9533 de $Ni(NO_3)_2.6H_2O$ dans une solution de HNO_3 0,5 M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M.

4. MODE OPERATOIRE

Solution de nickel à 10 mg/l : placer 1 ml de la solution-mère (3.8) dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 5 ml d'acide nitrique (3.2); compléter au volume avec de l'eau déminéralisée .

Solution de nickel à 50 µg/l : placer 1 ml de la solution de nickel à 10 mg/l dans une fiole jaugée de 200 ml, 10 ml d'acide nitrique (3.2) et compléter avec de l'eau déminéralisée.

Gamme d'étalonnage : 0, 50, 100 et 150 µg/l de nickel.

Le cycle du distributeur automatique permet de réaliser cet étalonnage sur la plate-forme à partir de la solution de nickel à 50 µg/l.

5. PREPARATION DES ECHANTILLONS

5.1. Cas des échantillons liquides ou en solution

Aucune préparation ou dilution de l'échantillon n'est nécessaire ; les échantillons sont placés directement dans les godets de l'injecteur automatique.

5.2. Cas des échantillons solides

Les échantillons solides sont minéralisés par voie sèche.

6. DETERMINATIONS

Le graphe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en nickel) donne la concentration en nickel des échantillons.

DOSAGE DU POTASSIUM PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Le potassium est dosé après minéralisation par voie sèche par spectrométrie d'absorption atomique.

L'addition d'un tampon spectral (chlorure de césium) pour éviter l'ionisation du potassium est nécessaire.

2. APPAREILLAGE

2.1 Verrerie

Fioles jaugées de 100 et 200 ml (classe A)
Pipettes jaugées de 1, 2, 4 et 10 ml (classe A)
Vase cylindrique de 100 ml

2.2 Paramètres instrumentaux (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique
flamme air-acétylène oxydante (débit-air: 3 l/mn; débit-acétylène: 1,8 l/mn)
Lampe à cathode creuse (potassium)
longueur d'onde : 769,9 nm
largeur de la fente : 0,5 nm
intensité de la lampe : 7 mA
pas de correction d'absorption non spécifique.

3. RÉACTIFS

3.1 Eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 Chlorure de césium (CsCl)

3.3 Solution de chlorure de césium à 5 % en césium : Dissoudre 6,330 g de chlorure de césium dans 100 ml d'eau déminéralisée.

3.4 Solution-mère de potassium à 1 g/l du commerce ou préparée de la manière suivante : dissoudre 2,5856 g KNO_3 dans l'eau, ajuster à 1 l.

3.5 Solution diluée de potassium à 100 mg/l : Placer 10 ml de la solution-mère de potassium à 1 g/l dans une fiole jaugée de 100 ml et 1 ml d'acide nitrique pur; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

3.6 Gamme d'étalonnage à 0, 2, 4, 6 et 8 mg de potassium par litre :

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, introduire 0 ; 2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 8,0 ml de la solution de potassium à 100 mg/l ; ajouter dans toutes les fioles

jaugées 2 ml de la solution de chlorure de césium ; ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

Les solutions-étalons préparées contiennent 1 g de césium par litre.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

4.1. Produits œnologiques sous forme liquide ou en solution

Dans une fiole jaugée de 50 ml, placer 1 ml de la solution de chlorure de césium à 5% et un volume d'échantillon tel qu'après avoir complété au volume avec de l'eau déminéralisée la concentration en potassium à mesurer est inférieure à 8 mg/l.

4.2. Produits œnologiques sous forme solide

Procéder à une minéralisation par voie sèche (reprendre les cendres par 2 ml d'acide chlorhydrique dans une fiole de 100 ml, ajouter 2 ml de chlorure de césium à 5% et compléter au volume par de l'eau déminéralisée).

Réaliser un blanc avec de l'eau déminéralisée.

5. DÉTERMINATIONS

Présenter successivement les solutions d'étalonnage.

Faire une lecture de l'absorbance pendant 10 secondes ; réaliser deux mesures.

Etablir la courbe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en mg/l de potassium).

Présenter ensuite les échantillons, faire une lecture de l'absorbance pendant 10 secondes ; réaliser deux mesures.

Déduire la concentration en potassium dans les produits œnologiques en mg/kg.

DETERMINATION DE LA CAPACITE D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE A COUPER LES CHAINES PECTIQUES PAR LA MESURE DE LA VISCOSITE (OIV-Oeno 351-2009)

1. PRINCIPE

On se propose ici de mesurer la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire de moitié la viscosité d'une solution standard, dans des conditions déterminées de pH, de température et de temps.
C'est une mesure purement technologique destinée à tester l'efficacité clarifiante réelle de l'enzyme. Elle rend compte essentiellement de l'activité "pectinase" qui ne peut pas être déduite directement de la libération de l'acide galacturonique dans le milieu.

Remarque
Pour mesurer l'activité de l'enzyme, deux approches peuvent être réalisées :

- soit le temps que met une concentration donnée d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié,
- soit la concentration nécessaire d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié dans un temps donné.

Des tests montrent que, tant que le substrat n'est pas limitant :

- dans le premier cas, le logarithme de la viscosité (temps d'écoulement) est inversement proportionnel au temps de réaction et,
- dans le deuxième cas, le logarithme de la viscosité est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme dans le milieu.

Dans un cas comme dans l'autre, il est facile de trouver, soit le temps, soit la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire la viscosité de moitié à partir d'une gamme judicieusement choisie.

2. CONDITIONS REACTIONNELLES

Milieu tampon phosphate 70 mmol/l et citrate 30 mmol/l
Substrat : Pectine de pomme estérifiée à 70-75% (par ex : Sigma P 8471), diluée à 10 g/l dans le tampon.

pH = 3,5
Température : 30 °C
Temps de réaction : 15 minutes.
Pectinase: gamme de concentrations encadrant environ 10 mg/l de poids sec d'enzyme dans l'échantillon soit par exemple 0,5 mg dans 50 ml de substrat. Ceci correspondant à la quantité

d'enzyme susceptible de faire diminuer la viscosité du substrat de moitié en 15 minutes dans les conditions décrites ci-dessus.

3. APPAREILLAGE

3.1 Thermostat à bain ou à circulation d'eau à 30 °C ± 1 °C
3.2 Viscosimètre à écoulement (A.3.1 :Fig. 2) ayant une valeur d'eau - c'est-à-dire le temps d'écoulement de l'eau entre les deux repères - de 18 à 20 secondes environ (soit un capillaire de diamètre de 0,5 à 0,6 mm environ)
3.3 Chronomètre
3.4 Balances analytiques (sensibilité 0.001g).
3.5 pH-mètre.
3.6 Agitateur magnétique, verrerie traditionnelle de laboratoire.
3.7 Filtres rapides en papier.
3.8 Micropipettes ou microseringues permettant de délivrer des volumes de 5 à 500 µl.

4. PRODUITS PURS

4.1 Acide citrique pur (99.5%)
4.2 Hydrogénophosphate de sodium dihydrate pur (Na_2 $HPO_4.2H_2O$) (99.0%)
4.3 Pectine de pomme estérifiée à 70-75% de pureté supérieure à 90 % (par ex : Sigma P 8471),
4.4 Eau distillée ou désionisée
4.5 Hydroxyde de sodium pur (98%)
4.6 Acide chlorhydrique pur (11,5 M) (33.5%)
4.7 Pectinase dont il faut mesurer l'activité.

5. SOLUTIONS

Chaque solution doit être homogénéisée avant l'utilisation

5.1 Hydroxyde de sodium 2M
Peser 80 g d'hydroxyde de sodium pur (4.5) dans une fiole jaugée de 100 ml dissoudre dans de l'eau désionisée (4.4) ajuster au trait de jauge après dissolution complète et refroidissement.

5.2 Acide chlorhydrique 2 M
Dans une fiole jaugée de 100 ml à moitié remplie d'eau désionisée placer la quantité suffisante d'acide chlorhydrique pur (4.6) pour obtenir une solution finale 2M, (après avoir complété jusqu'au trait de jauge).

5.3 Tampon phosphate 47 mmol/l, citrate 53 mmol/l, pH 3,5

5.3.1 Placer 800 ml d'eau désionisée (4.4) dans un ballon jaugé de 1000 ml

5.3.2 peser 11,22 g d'acide citrique (4.1)

5.3.3 peser 8,30 g de hydrogénophosphate de sodium dihydrate pur ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (4.2)

5.3.4 transférer les produits chimiques pesés quantitativement dans le ballon jaugé de 1000 ml tout en remuant

5.3.5 mélanger jusqu'à entière dissolution

5.3.6 ajuster le pH à 3,50 ± 0,05, à la température ambiante, avec de l'hydroxyde de sodium 2 M (5.1), ou l'acide chlorhydrique 2 M (5.2) selon le pH initial

5.3.7 ajuster au trait de jauge par l'eau désionisée (4.4). Mélanger

Stabilité : 8 jours à la température ambiante.

5.4. Substrat : Pectine de pomme (4.3),

5.4.1 Placer un récipient cylindrique de 400 ml dans un bain d'eau thermostatée à 40 °C ± 3°C sur un agitateur rotatif

5.4.2 ajouter 250 ml de tampon à pH 3,5 (5.3), exactement mesuré, dans le récipient cylindrique

5.4.3 maintenir une agitation douce à 40 °C

5.4.4 peser 2,500 g ± 0,01 g de pectine (4.3)

5.4.5 ajouter lentement la pectine sous forte agitation

5.4.6 puis agiter lentement pendant 60 minutes en maintenant la température à 40 °C

5.4.7 arrêter de remuer et refroidir à 30 °C ± 3 °C

5.4.8 filtrer sur papier filtre rapide (3.8) si nécessaire (présence de grumeaux)

Stabilité : 24 heures à la température ambiante.

5.5 Solution de pectinase à 100 g/l de poids sec (4.7)

5.5.1 peser 2,50 g ±0,01 g de pectinase en poudre ou granulés

5.5.2 transférer dans un ballon jaugé de 25 ml

5.5.3 ajuster au trait de jauge par le tampon à pH 3,5 (5.3)

5.5.4 dissoudre par agitation pendant 20 minutes sur un agitateur magnétique

Filtrer sur papier filtre rapide si l'enzyme est immobilisée sur un matériau insoluble à l'aide d'un filtre rapide (3.7)

5.5.5 Dans le cas de préparation enzymatique liquide, utiliser directement celle-ci.

Stabilité : 4 heures à la température ambiante.

6. MESURES

6.1 Placer le viscosimètre dans le bain d'eau à 30 °C ou utiliser tout dispositif permettant de faire la mesure de viscosité à 30 °C.
6.2 Mesurer la viscosité (en fait le temps d'écoulement entre les deux traits du viscosimètre) de la solution tampon à pH 3,5, soit t_o. Ce temps doit être proche de 20 secondes pour un capillaire de 0,5 à 0,6 mm de diamètre.
6.3 Mesurer le temps d'écoulement de la solution de pectine à 10 g/l soit T_p, ce temps doit être de l'ordre de 200 secondes ou plus.
6.4 Préparer une série de 4 ballons jaugés contenant 50 ml de pectine à 10 g/l, les placer dans le bain d'eau à 30 °C.
6.5 Ajouter dans le premier ballon, 5µl de la solution d'enzyme à 100 g/l, homogénéiser.
Puis toutes les 15 minutes environ rajouter successivement dans les autres fioles :
15 µl, 35 µl et enfin 100 µl de la solution d'enzyme à 100 g/l, homogénéiser.
6.6 Chronométrer le temps d'écoulement des différentes solutions entre les deux traits du viscosimètre exactement 15 minutes après l'ajout d'enzyme.

7. REPRESENTATION GRAPHIQUE DES VALEURS MESUREES

Retrancher du temps d'écoulement la valeur t_o correspondant au tampon à pH 3,5 seul.
Etablir le graphique représentant le logarithme temps d'écoulement en fonction de la concentration de l'enzyme.
Il doit exister au moins trois points alignés correspondant aux dilutions les plus fortes. Si ce n'est pas le cas, utiliser une solution d'enzyme plus diluée par exemple à 50 g/l ou même 10 g/l.

8. INTERPRETATION DES RESULTATS

Rechercher l'équation de la droite de régression passant par les trois points alignés :

$$T = a.x + b$$

En déduire la concentration nécessaire d'enzyme C pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié $(T_p - t_o)/2$ soit $T_{0,5}$.

9. EXEMPLES

9.1 Détermination de la concentration nécessaire d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié. (Tableau 1)
Temps d'écoulement du tampon seul t_o = 19,3 s

Tableau 1 :

Vol (µl) d'enzyme à 100g/l /50 ml de pectine	Concentration (g/l)	Temps écoulement (s)	Temps corrigé (s)	Log. Temps corrigé
0	0	230 (Tp)	210,7 (Tp - to)	2,32
5	0,01	190	170,7	**2,23**
25	0,05	107	87,7	**1,94**
100	0,2	32,8	13,5	**1,13**
500	1	23,8	4,5	0,65*

Temps corrigé = temps d'écoulement – temps d'écoulement du tampon à pH 3,5
* valeur non prise en compte
équation de la droite de régression (fig.1) y = -5,8366 +2,2844

$(T_p - t_o) /2 = 105$ s.
Log 105 = 2,02 → C = (2,28-2,02)/5,84 = 0,044
Donc il faut 0,044 g/l d'enzyme pour diminuer de moitié la viscosité d'une solution de pectine de pomme à 10 g/l à 30 °C durant 15 minutes.

On constate que 1 g/l d'enzyme a permis de réduire pratiquement totalement la viscosité de la solution de pectine en 15 minutes.

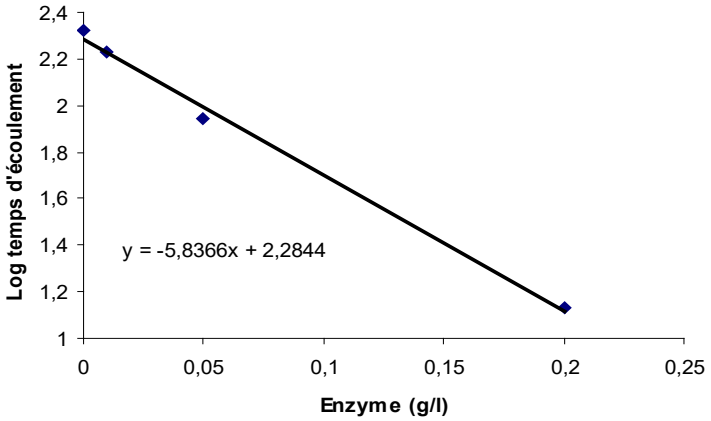


Fig.1 Diminution de la viscosité d'une solution de pectine en fonction de la concentration en enzyme.

9.2 Réduction de la viscosité d'une solution de pectine à 10 g/l en fonction du temps de réaction à 30 °C d'une enzyme à la concentration de 0,1 g/l. (fig. 2) - *A titre d'information*

Le temps d'écoulement du tampon est de 19,6 s.

Tableau 2 :

Temps de réaction (mn)	Temps d'écoulement (s)	Temps d'écoulement corrigé* (s)	Log du temps d'écoulement
0	170 (T_p)	150,7 ($T_p - t_o$)	2,18
11,5	101,4	82,1	1,91
15,6	86	66,7	1,82
21,08	72,8	53,5	1,73
29	59,83	40,53	1,61
40,31	48,79	29,49	1,47
57	40,08	20,78	1,32
90	32,25**	12,95	1,11
167	26,25**	6,95	0,84

* Temps d'écoulement corrigé
**valeurs non prises en compte, la quantité de pectine restante limitant la réaction.

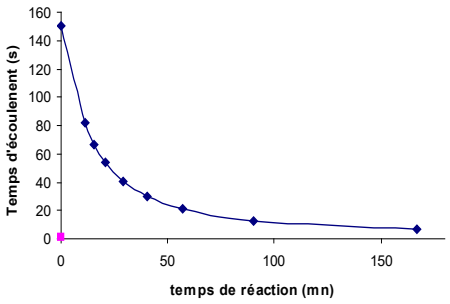


Fig. 2. Evolution de la viscosité d'une solution de pectine à 10 g/l en fonction du temps de réaction d'une enzyme à 0,1 g/l à 30 °C

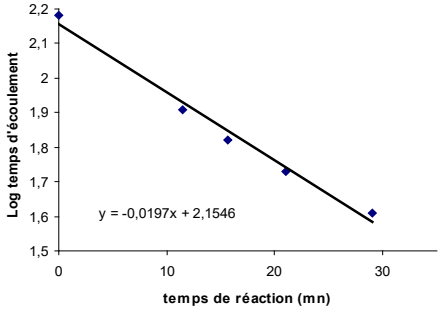


Fig.3. Evolution de la viscosité d'une solution de pectine à 10 g/l en fonction du logarithme temps de réaction d'une enzyme à 0,1 g/l à 30 °C.

Interprétation des résultats

Les valeurs du tableau 2 montrent qu'il faut une durée de réaction T/2 de 13,3 minutes pour réduire la viscosité de la solution de pectine à 10 g/l de moitié à 30 °C.

Par le calcul, à partir de la droite de régression de la fig. 3 :
Log75,35 = 1,877
d'où $T_0/2$ = (2,1545 - 1,877)/0,0197 =14,1 minutes.

10. BIBLIOGRAPHIE

Bertrand A. determination de la capacité d'une préparation enzymatique de type polygalacturonase à couper les chaines pectiques par la mesure de la viscosité OIV FV 1260

SUCRE DE RAISIN: DOSAGE DU SACCHAROSE PAR CLHP (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Les échantillons dilués ou mis en solution sont analysés par chromatographie liquide haute performance : Séparation sur colonne de silice greffée NH_2 et détection à l'aide d'un réfractomètre différentiel.

2. APPAREILLAGE ET CONDITIONS ANALYTIQUES (à titre d'exemple)

2.1 Chromatographe

- Colonne de silice greffée NH2 (longueur 20 cm, diamètre intérieur 4 mm granulométrie 5 µm)
- Un système de pompage
- Un passeur d'échantillons (éventuellement)
- Microfiltres de porosité 0,45 µm
- Détecteur à réfractométrie différentielle

2.2 Conditions chromatographiques (données à titre d'exemple)

L'eau utilisée est de type désionisée et microfiltrée.

L'acétonitrile est de qualité CLHP

La composition de la phase mobile est la suivante :

- Si la colonne est neuve : acétonitrile/eau (75/25)
- Quand la résolution fructose - glucose commence à se dégrader, la phase mobile est alors un mélange acétonitrile/eau 80/20.

Le débit est de 1 ml/mn.

3. REACTIFS ET SOLUTIONS ETALONS

3.1 Préparation de la solution de référence

Les produits chimiques utilisés pour la préparation de la solution mère sont de qualité "pur pour analyse".

La composition de cette solution est d'environ 10 g/l de chaque sucre (fructose, glucose et saccharose).

La solution de référence est préparée tous les 15 jours (maximum) et conservée au réfrigérateur dans la fiole jaugée de préparation de 100 ml.

DOSAGE DU SELENIUM PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Après minéralisation de l'échantillon par voie humide, le sélénium est dosé par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme (atomisation électro-thermique au four-graphite).

2. APPAREILLAGE

2.1 Verrerie

Fioles jaugées de 50, 100 ml (classe A)
Pipettes jaugées de 1, 5 et 10 ml (classe A)
Tubes en polypropylène de 50 ml, avec bouchon à vis.

2.2 Paramètres instrumentaux (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un atomiseur à tube de graphite.

longueur d'onde 196,0 nm
lampe à cathode creuse (sélénium)
largeur de fente: 1,0 nm.
intensité de la lampe : 10 mA
correction du fond continu par effet Zeeman

introduction à chaud des échantillons dans le four-graphite, avec un distributeur automatique (eau de rinçage contenant 2 gouttes de Triton par litre).

mesure du signal : en hauteur de pic
durée de la mesure : 1 seconde
nombre de mesures par échantillon : 2
Tube en graphite pyrolytique :
four en graphite pyrolytique contenant une plate-forme de L'Vov tantalisée.

tantalisation d'une plate-forme : voir le mode opératoire donné précédemment.
gaz inerte : argon.
paramètres du four : tableau I

Tableau I - Paramètres du four pour le dosage du sélénium

étape	température (°C)	durée (s)	débit du gaz (l/mn)	type de gaz	lecture du signal
1	85	5	3,0	argon	non
2	95	40	3,0	argon	non
3	120	10	3,0	argon	non
4	1 000	5	3,0	argon	non
5	1 000	1	3,0	argon	non
6	1 000	2	0	argon	non
7	2 600	0,8	0	argon	oui
8	2 600	2	0	argon	oui
9	2 600	2	3,0	argon	non

2.3 Paramètres de l'échantillonneur automatique (tableau II)
(donnés à titre d'exemple)

Tableau II - Paramètres de l'échantillonneur automatique.

	volumes injectés en µl		
	solution	blanc	modificateur de matrice
blanc		17	3
étalon n°1 50 µg/l	5	12	3
étalon n°2 100 µg/l	10	7	3
étalon n°3 150 µg/l	15	2	3
échantillon	15	2	3

3. REACTIFS

3.1 Eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 Acide nitrique pur pour analyse à 65 %

3.3 Chlorure de palladium anhydre (59 % en Pd)

3.4 Nitrate de magnésium hexahydraté pur pour analyse

3.5 Dihydrogénophosphate d'ammonium

3.6 Modificateur de matrice : mélange de chlorure de palladium et de nitrate de magnésium (dissoudre 0,25 g de $PdCl_2$ et 0,1 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ dans 50 ml d'eau déminéralisée) ou dihydrogénophosphate d'ammonium à 6% (dissoudre 3 g de $NH_4H_2PO_4$ dans 50 ml d'eau déminéralisée).

3.7 Solution-mère de sélénium à 1 g/l, du commerce ou

préparée de la manière suivante : dissoudre 1,4052 g SeO_2 dans une solution de HNO_3 0,5 M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M.

3.8 Solution de sélénium à 10 mg/l : placer 1 ml de la solution-mère à 1 g/l dans une fiole jaugée de 100 ml ; ajouter 5 ml d'acide nitrique à 65 % ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse

3.9 Solution de sélénium à 50 µg/l : placer 0,5 ml de la solution de sélénium à 10 mg/l, 5 ml d'acide nitrique à 65 % dans une fiole jaugée de 100 ml ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

3.10 Gamme d'étalonnage : 0, 50, 100 et 150 µg/l de sélénium.

Le cycle du distributeur automatique permet de réaliser cet étalonnage sur la plateforme à partir de la solution de sélénium à 50 µg/l.

4. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Peser avec précision une prise d'essai de 1 à 3 g dans le tube gradué ; ajouter 5 ml d'acide nitrique à 65 %; fermer avec le bouchon à vis ; laisser 12 heures à température ambiante ;
placer le tube dans un bain d'eau à 90 °C pendant 3 heures (les bouchons sont désserrés pendant le chauffage) ; laisser refroidir ; ajuster le volume à 20 ml avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

5. DETERMINATIONS

Etablir le graphe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en µg/l de sélénium) ; déterminer la concentration en sélénium des échantillons.

Déduire la concentration en sélénium dans le minéralisat, puis dans l'échantillon en µg/kg.

DOSAGE DU SODIUM PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1. PRINCIPE

Le sodium est dosé après minéralisation par voie sèche par spectrométrie d'absorption atomique.

Une addition d'un tampon spectral (chlorure de césium) pour éviter l'ionisation du sodium est nécessaire.

2. APPAREILLAGE

2.1 Verrerie

Fioles jaugées de 50 et 100 ml (classe A)
Pipettes jaugées de 2,0 ; 5,0 ; 10,0 ml (classe A)
Pipette automatique de 1000 µl
Vase cylindrique de 100 ml.

2.2 Paramètres instrumentaux (donnés à titre d'exemple)

Spectrophotomètre d'absorption atomique
flamme air-acétylène oxydante (débit-air: 3,1 l/mn; débit-acétylène: 1,8 l/mn)
longueur d'onde : 589,0 nm
lampe à cathode creuse (sodium)
largeur de la fente : 0,2 nm
intensité de la lampe : 5 mA
pas de correction d'absorption non spécifique

3. RÉACTIFS

3.1 Eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 Acide nitrique pur pour analyse à 65 %

3.3 Solution de chlorure de césium à 5 % en césium :
Dissoudre 6,330 g de chlorure de césium dans 100 ml d'eau déminéralisée pure pour analyse.

3.4 Solution-mère de sodium à 1 g/l du commerce ou préparée de la manière suivante :
dissoudre 3,6968 g $NaNO_3$ dans l'eau, ajuster à 1 l.

3.5 Solution diluée de sodium à 10 mg/l :
Placer 1 ml de la solution-mère à 1 g/l dans une fiole jaugée de 100 ml, 1 ml d'acide nitrique à 65 ,%, compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

3.6 Gamme d'étalonnage 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg de sodium par litre:
Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 0 ; 2,5 ; 5,0 ; 7,5; 10 ml de la solution diluée de sodium ; ajouter dans toutes les fioles jaugées 2 ml de la solution de chlorure de césium et ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

Les solutions-étalons préparées contiennent 1 g de césium par litre ; elles sont conservées dans des flacons en polyéthylène.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

4.1. Produits œnologiques sous forme liquide ou en solution

Dans une fiole jaugée de 50 ml, placer 1 ml de la solution de chlorure de césium à 5% et un volume d'échantillon tel qu'après avoir complété au volume avec de l'eau déminéralisée la concentration en sodium à mesurer est inférieure à 1 mg/l.

4.2. Produits œnologiques sous forme solide

Procéder à une minéralisation par voie sèche (reprendre les cendres par 2 ml d'acide chlorhydrique dans une fiole de 100 ml, ajouter 2 ml de chlorure de césium à 5% et compléter au volume par de l'eau déminéralisée).
Réaliser un blanc avec de l'eau déminéralisée.

5. DÉTERMINATIONS

Présenter successivement les solutions d'étalonnage.
Faire une lecture de l'absorbance pendant 10 secondes ; réaliser deux mesures.
Etablir la courbe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en mg/l de sodium).
Présenter ensuite les échantillons ; déterminer la concentration en sodium des échantillons dilués en mg/l.
Déduire la concentration en sodium dans les produits œnologiques en mg/kg.
Les dosages en flamme air-acétylène sont réalisés manuellement.

RECHERCHE DES SULFATES
(Oeno 18/2003)

Dans un tube à essais de 160 × 16 mm, placer le volume prescrit de solution obtenue par le moyen indiqué dans chaque monographie ; ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique dilué (R) ; ajuster à 20 ml avec de l'eau et ajouter 2 ml de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 (R).

Comparer l'opalescence ou le trouble éventuel à celui du témoin préparé avec 1 ml de solution à 0,100 g d'acide sulfurique par litre (soit 0,10 mg de H_2SO_4,) additionné de 1 ml d'acide chlorhydrique dilué (R) et d'eau jusqu'au volume de 20 ml et de 2 ml de solution de chlorure de baryum (R). Ce tube contient 100 µg de H_2SO_4.

TANTALISATION DES PLATES-FORMES DE L'Vov EN GRAPHITE (Oeno 18/2003)

PRÉPARATION D'UNE SOLUTION DE TANTALE A 6 % (m/v) SELON LE PROCÉDÉ DE ZATKA

Trois grammes de poudre de tantale sont déposés à l'intérieur d'un vase cylindrique en téflon (R) de 100 ml
Ajouter 10 ml d'acide fluorhydrique dilué au demi, 3 g d'acide oxalique déshydraté et 0,5 ml d'eau oxygénée à 30 vol
Chauffer l'ensemble avec précaution pour dissoudre le métal.
Ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée dès que la réaction se ralentit ; quand la dissolution est complète, ajouter 4 g d'acide oxalique et 30 ml d'eau.
L'acide est dissous et la solution est portée à 50 ml avec de l'eau déminéralisée ultra pure.
Stocker cette solution dans un flacon en plastique.

TRAITEMENT DES PLATES-FORMES EN GRAPHITE

La plate-forme est déposée à l'intérieur d'un tube de graphite ou en graphite pyrolytique usagé. L'ensemble est fixé sur l'unité d'atomisation du spectrophotomètre

Un volume de 10 µl de la solution de tantale est injecté sur la plate-forme à l'aide du distributeur automatique d'échantillons ;
Mettre la solution de tantale à l'emplacement du blanc sur le porte échantillons.
Le cycle de températures est fixé selon le programme suivant:

séchage à 100 °C pendant 40 secondes
minéralisation à 900 °C , pendant 60 secondes
atomisation à 2600 °C pendant 2,5 secondes
L'argon est utilisé comme gaz inerte.

REFERENCE :

Zatka, Anal. Chem., vol 50, n° 3, mars 1978

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL
(Oeno 18/2003)

1. APPAREIL

1.1 L'appareil utilisé pour séparer NH_3 est soit un appareil de distillation avec colonne rectificatrice soit un appareil à entraînement par la vapeur d'eau (schéma) constitué par :

Un ballon **A** de 1 l en verre borosilicaté servant de chaudière, muni d'un entonnoir à robinet pour le remplissage. Il peut être chauffé par un fourneau à gaz ou électrique.

Une allonge **C** qui sert à recueillir le liquide épuisé venant du barboteur **B**.

Un barboteur **B** de 500 ml à col incliné; le tube d'arrivée doit atteindre la partie la plus basse du ballon. Le tube de départ est muni d'une boule antiprimage qui constitue la partie supérieure du barboteur. Un entonnoir **E** à robinet permet l'introduction du liquide à traiter et de la lessive alcaline.

Un réfrigérant de 30 à 40 cm de longueur, vertical, terminé par une boule à douille fine.

Une fiole conique de 250 ml destinée à recevoir le distillat.

1.2 Matras à minéralisation, ballon de forme ovoïde de 300 ml, à long col.

2. REACTIFS

Acide sulfurique concentré (R).

Catalyseur de minéralisation (R).

Solution d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 (m/m) (R).

Solution d'acide borique à 4 p. 100 (R).

Solution d'acide chlorhydrique 0,1 M.

Indicateur mixte au rouge de méthyle et au bleu de méthylène (R).

La chaudière doit être garnie d'eau acidulée par 1 p.1 000 d'acide sulfurique. Il convient de faire bouillir ce liquide avant toute opération, le robinet de purge P étant ouvert, pour chasser le CO_2.

3. MODE OPERATOIRE

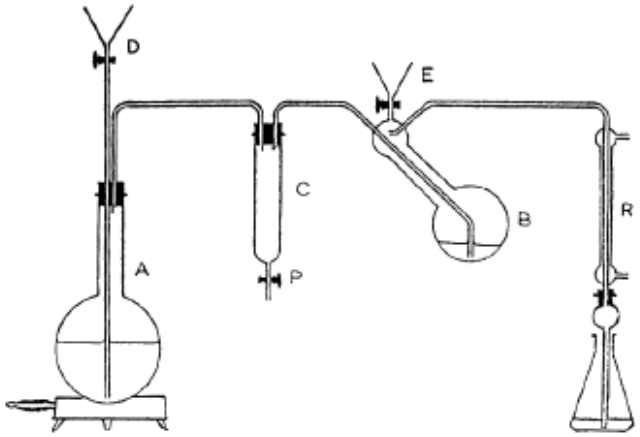
Dans le matras à minéralisation, introduire la prise d'essai, contenant de 4 à 50 mg d'azote. Ajouter 5 g de catalyseur de minéralisation (R) et 10 ml d'acide sulfurique concentré (R), si la quantité de matière organique sèche à minéraliser est inférieure à 500 mg. Augmenter ces quantités si une prise d'essai plus importante de matière organique doit être employée.

Chauffer à feu nu, sous une hotte, le col du matras étant maintenu incliné, jusqu'à ce que la solution soit incolore et que les parois du matras soient débarrassées de produits carbonisés.

Après refroidissement, diluer avec 50 ml d'eau et refroidir; introduire ce liquide dans le barboteur **B** par l'entonnoir **E**, ajouter ensuite 40 à 50 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 30 p. l00 (R), de manière à obtenir l'alcalinisation franche du liquide et entraîner l'ammoniac par la vapeur en recueillant le distillat dans 5 ml de solution d'acide borique (R) placés préalablement dans la fiole conique réceptrice avec 10 ml d'eau, l'extrémité de l'ampoule plongeant dans le liquide. Ajouter 1 ou 2 gouttes d'indicateur mixte et recueillir 70 à 100 ml de distillat.

Titrer le distillat par la solution 0,1 M d'acide chlorhydrique jusqu'à virage au violet rose de l'indicateur.

1 ml de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique correspond à 1,4 mg d'azote.



Appareil pour la distillation de l'ammoniaque
dans un courant de vapeur d'eau
(D'après PARNAS et WAGNER)

Les robinets P et E peuvent être remplacés par un raccord plastique avec pince de Mohr.

COMPTAGE DES CELLULES DE LEVURES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DANS LES CULTURES DE LEVURES (OIV-OENO 713B-2025)

1. DOMAINE D'APPLICATION

Méthode visant à quantifier les cellules de levures viables, stressées (membranes perméables) et mortes dans les cultures de levures œnologiques, telles que définies par l'OIV.

Cette méthode qui utilise une technique de double marquage ne permet pas la quantification des cellules viables métaboliquement inactives (membranes imperméables).

La méthode peut être appliquée à l'analyse des préparations de levures sélectionnées (LSA et levains).

Les limites de quantification dépendent de la performance de l'appareillage utilisé et de la méthode de préparation de l'échantillon.

2. DEFINITIONS

Cytométrie en flux : la cytométrie en flux est une technique qui permet une analyse rapide et multiparamétrique de cellules individuelles en solution. Le cytomètre en flux utilise des lasers comme sources lumineuses afin de produire des signaux lumineux de diffraction et de fluorescence qui sont lus par des détecteurs, comme des photodiodes ou des tubes photomultiplicateurs. Ces signaux sont convertis en signaux électroniques qui sont analysés par un ordinateur. Les populations de cellules peuvent être différentiées et/ou caractérisées en fonction des caractéristiques de leur fluorescence ou de leur diffraction lumineuse.

Diffraction à angle faible (forward scatter, FSC) : signal produit par la diffraction de la lumière par la particule (cellule). Par convention, il est enregistré à 180° de la source lumineuse et peut être directement relié à la taille de la particule.

Diffraction latérale (side scatter, SSC) : signal produit par la diffraction de la lumière par la particule (cellule). Par convention, il est enregistré à 90° de la source lumineuse et peut être directement relié à la complexité de la structure de la particule.

Canaux de fluorescence (FLx) : signaux produits par l'émission d'une fluorescence due aux fluorochromes associés aux particules au moyen de couleurs adéquates. Les différentes longueurs d'onde d'émission sont séparées par l'intermédiaire de filtres optiques et, par convention, numérotées successivement (FL1, FL2, etc.).

Compensation : processus de correction requis du fait du débordement spectral de fluorescence, consistant en la soustraction du signal de tout fluorochrome donné de tous les détecteurs à exception de celui consacré à la mesure de cette coloration. La compensation est typiquement appliquée aux canaux FL2 ou FL3, afin de soustraire la contribution du fluorochrome qui présente le pic maximal d'émission dans le canal FL1.

Comptage volumétrique : mesure du nombre d'événements (cellules) dans un volume d'échantillon donné, habituellement mesuré par deux électrodes placées à différents niveaux dans la cuvette de l'échantillon. Des solutions alternatives peuvent être utilisées, par ex. une pompe volumétrique.

Évènement : Un évènement est défini comme la détection d'une particule individuelle passant au travers du ou des faisceaux lasers de l'appareil. Chaque évènement correspond à une série de mesures de différentes propriétés optiques et physiques de cette particule. Il revient aux opérateurs de démontrer qu'un évènement peut être associé à une cellule individuelle en vérifiant l'absence de cellules regroupées (doublets, triplets, etc.).

3. PRINCIPE

Une suspension cellulaire, obtenue à partir d'une dilution décimale appropriée de l'échantillon, est analysée par cytométrie en flux en mode volumétrique, après marquage avec des colorants fluorescents permettant de différencier les cellules présentant une activité enzymatique (vivantes) et les cellules ayant une membrane cytoplasmique altérée (mortes). Dans certains cas, il est également possible d'identifier une 3ème sous-population de cellules présentant une activité métabolique, mais avec une altération de la perméabilité de la membrane cellulaire. Cette sous-population est généralement considérée comme formée de cellules stressées, mais viables.

La présente méthode est une méthode générique utilisant un laser bleu unique et deux fluorochromes. Il est également possible d'utiliser des méthodes plus

sophistiquées employant des cytomètres dotés de lasers multiples et un marquage multiple.

Deux types de fluorochromes sont utilisés dans la présente méthode :

- Iodure de propidium (IP) : il s'agit d'un agent intercalant des acides nucléiques (ADN ou ARN). Il ne pénètre que dans les cellules dont la membrane plasmique est perméable. Il est considéré que ces dernières correspondent essentiellement à des cellules mortes, ou à des cellules soumises à un stress membranaire (sous l'effet de l'éthanol, par exemple). Leur pic d'excitation se situe entre 520 nm et 550 nm, avec une fluorescence maximale émise entre 610 nm et 630 nm. Les cellules marquées IP(−) sont donc considérées comme viables, et les cellules IP(+) comme mortes ou présentant une membrane plasmique perméable.

- Diacétate de 5(6)-carboxyfluorescéine (CFDA) : il s'agit d'un substrat estérase pouvant pénétrer dans la cellule et qui agit comme indicateur d'activité métabolique (estérase). Au cours de l'hydrolyse provoquée par les estérases intracellulaires, cet ester d'acétoxyméthyle produit de la caroboxyfluorescéine, dont le pic d'excitation se situe à 498 nm, avec une fluorescence maximale émise à 516 nm. Son spectre d'émission s'étend jusqu'à 650 nm, ce qui peut amener à nécessiter une compensation sur d'autres canaux (FL2). Les cellules marquées CFDA(+) sont donc considérées comme métaboliquement (estérase) actives, et les cellules CFDA(−) comme métaboliquement inactives.

Tableau 1. Résumé des interprétations basées sur les réponses du fluorochrome

Quadrant	**IP(−)**	**IP(+)**
CFDA(−)	Non interprétable dans cette méthode	Mortes
CFDA(+)	Viables et actives	Cellules actives présentant une membrane plasmique altérée perméable à l'IP (cellules stressées)

Remarque 1 : Une population de cellules est définie IP(−), reflétant une intégrité membranaire, et CFDA(−), reflétant une activité métabolique non détectable.

Remarque 2 : Dans cette méthode, les cellules ne sont pas dissociées d'un éventuel bruit de fond. Le quadrant IP(−), CFDA(−) est donc non interprétable.

4. REACTIFS ET PRODUITS

- Verrerie de laboratoire courante, cuvettes pour cytométrie en flux et liquide d'entraînement, lorsque l'instrument l'exige.

- Éprouvettes (16 × 160 mm ou similaires) contenant 9 mL de tampon phosphate salin (PBS) filtré à l'aide d'un filtre d'une porosité 0,2 µm (pH 7,4).

- Diacétate de 5(6)-carboxyfluorescéine (en poudre) (CFDA, n° CAS : 124387-19-5).

- Iodure de propidium (en poudre) à 95 % (IP ; n° CAS : 25535-16-4).

- Diméthylsulfoxyde pure sous forme liquide (DMSO ; n° CAS : 67-68-5).

- Culture pure de *S. cerevisiae* (par ex. : souche ATCC 9763) à une concentration nominale de 10^5 cellules/mL.

- Solution aqueuse de NaCl à 8,5 g/L, stérilisée par filtration ou autoclave.

- Solution de CFDA dans du DMSO ou de l'acétone à 0,1 mg/L.

- Solution d'IP dans du DMSO ou en solution aqueuse à 1 mg/L.

Remarque 1 : La dilution des fluorochromes est réalisée dans du DMSO. Il est également possible de la réaliser dans de l'acétone. Il apparaît cependant que le mélange acétone/DMSO produit davantage de bruit de fond sur le cytomètre, et il est donc recommandé de n'utiliser que du DMSO.

5. APPAREILLAGE

- Cytomètre en flux équipé d'un laser émettant à 488 nm (50 mW) et de paramètres optiques FSC, SSC, FL1 (530 nm), FL2 (630 nm) et FL3 (670 nm).

- Agitateur de type Vortex.

- Verrerie de laboratoire.
- Filtre de laboratoire stérilisant d'une porosité de 0,2 µm (préférablement en acétate de cellulose, qui limite le bruit de fond).
- Plaque pour cytométrie en flux.
- Micropipettes de 1 mL et 0,2 mL à embouts stériles.
- Balance analytique (précision de ± 0,01 g).
- Centrifugeuse de laboratoire.

Remarque : Si la stérilité ne s'avère pas essentielle, il est cependant recommandé de maintenir un haut niveau d'hygiène et d'utiliser du matériel et des réactifs stériles.

6. ÉCHANTILLONNAGE (PREPARATION DE L'ECHANTILLON)

Prélever et transporter l'échantillon de culture de levures au laboratoire de manière adéquate, en s'assurant qu'il soit représentatif de la masse originelle.

50 g d'échantillon présentant les caractéristiques décrites dans la monographie COEI-1-SACCHA « Levures sélectionnées *Saccharomyces* spp. », stockés conformément aux instructions du fabricant, s'avèrent suffisants pour l'analyse.

7. MODE OPERATOIRE

L'analyse par cytométrie en flux étant immédiate (moins de trois minutes avec un appareillage moderne), il existe peu de risques de contamination dus à la manipulation de l'échantillon en dehors de la hotte à flux laminaire ou durant la lecture cytométrique. Il est cependant recommandé de maintenir un haut niveau d'hygiène et d'utiliser du matériel et des réactifs stériles.

La présente procédure est fournie à titre d'exemple. Des variations peuvent être introduites par le laboratoire. La technique de cytométrie en flux exige d'adapter constamment les dilutions en fonction de l'appareil utilisé ainsi que de la charge microbiologique des produits à analyser.

7.1 Mise au point du cytomètre en flux

Mettre sous tension le cytomètre en flux et procéder au nettoyage de l'appareil afin d'éviter des interférences lors de l'analyse. Régler les canaux d'acquisition FSC, SSC, FL1 (acquisition à 530 nm), FL2 (acquisition à 630 nm) et FL3 (acquisition à 670 nm) sur une échelle logarithmique.

Le cytomètre en flux est considéré comme prêt pour l'analyse une fois écartée la présence d'évènements susceptibles d'interférer avec l'acquisition de l'échantillon dans le canal FSC durant la lecture d'un échantillon contenant uniquement du liquide d'entraînement.

Exécuter la lecture d'une culture pure de *S. cerevisiae* en prenant soin de régler les voltages des canaux FSC et SSC, le cas échéant, afin que le pic du signal dans les deux canaux FSC et SSC soit clairement séparé du bruit de fond. Si le cytomètre en flux le permet, il est possible de soustraire la contribution du bruit de fond en agissant sur le seuil du paramètre FSC. Élaborer un graphique par points en intégrant les signaux FSC et SSC et repérer la zone contenant la population de cellules de levures, en l'identifiant avec une fenêtre d'acquisition spécifique (figure 1).

7.2 Coloration de l'échantillon

Dans le cas de cultures de levures sélectionnées, procéder à une réhydratation et à une dilution conformément à la résolution OIV-OENO 632-2021.

Diluer l'échantillon de levures réhydratées avec la solution de NaCl en pratiquant une dilution décimale allant de 10^{-3} à 10^{-4} en fonction de la performance de l'appareil utilisé.

Procéder au marquage en introduisant, par exemple, 10 µL de solution de CFDA et 10 µL de solution d'IP dans 980 µL de vin dilué.

Laisser incuber l'échantillon à température ambiante pendant environ 10 minutes, dans l'obscurité.

Au terme de l'incubation, homogénéiser et procéder à la lecture de l'échantillon, après avoir configuré le cytomètre en flux en mode de lecture volumétrique.

Remarque 1 : La concentration en CFDA dans l'échantillon marqué est de l'ordre de 2 mg/L à 5 mg/L. La concentration en IP dans l'échantillon marqué est de l'ordre de 3 mg/L à 10 mg/L.

Remarque 2 : L'ordre des apports de fluorochromes est sans importance. Ils peuvent être introduits simultanément dans une même solution.

Remarque 3 : Le marquage reste habituellement stable pendant une heure ou plus.

7.3 Analyse cytométrique en flux

Lire l'échantillon en prenant soin de régler les paramètres de l'appareil de manière à ce que la population de levures se trouve dans la fenêtre d'acquisition précédemment identifiée avec la culture pure de *S. cerevisiae*.

Régler les voltages des canaux FL1 et FL2 de manière à mieux séparer le pic d'émission de l'échantillon du bruit de fond (autofluorescence). Afin d'éviter des aberrations dues au spectre d'émission du FDA, que le paramètre FL2 pourrait également intercepter, ajuster adéquatement la compensation de l'appareil afin de soustraire de FL2 la contribution de FL1. Le cas échéant, le canal FL3 pourrait être utilisé au lieu du canal FL2 afin de permettre une meilleure discrimination des signaux de fluorescence liés aux cellules vivantes (FL1) et mortes (FL2 ou FL3). Procéder au comptage volumétrique des cellules présentes dans l'échantillon. Intégrer dans un graphique par points les canaux FL1 et FL2 (ou FL3) pour mieux visualiser la séparation des populations cellulaires (figure 2). Considérer comme cellules vivantes les évènements recueillis dans le canal FL1 et issus de la fenêtre d'acquisition contenant la population de levures, repérée dans le graphique par points des paramètres physiques FSC et SSC. Considérer comme cellules mortes les évènements recueillis dans le canal FL2 (ou FL3) et issus de la fenêtre d'acquisition contenant la population de levures, repérée dans le graphique par points des paramètres physiques FSC et SSC. Considérer comme cellules stressées, mais viables, la population d'évènements qui reste positive sur les deux canaux (FL1 et FL2 ou FL3) après compensation adéquate des signaux.

8. CALCULS

Une fois le comptage volumétrique terminé, noter le nombre de cellules vivantes, mortes et endommagées comptées dans l'unité de volume ou de poids, en fonction du volume échantillonné par le cytomètre en flux, en tenant compte des dilutions décimales réalisées. S'agissant d'un comptage cellulaire direct, il est

possible d'exprimer le résultat en « cellules/g », tout en vérifiant l'absence de doublets ou de triplets.

9. BIBLIOGRAPHIE

1. Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. et Alexandre, H, Application of flow cytometry to wine microorganisms, *Food Microbiology*, 2017, vol. 62, p. 221-231. DOI : 10.1016/j.fm.2016.10.023.

2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), CLSI H62: Validation of Assays Performed by Flow Cytometry, 1ère édition, 2022. ISBN: 978-1-68440-129-1.

3. ISO 7218:2007 amd1:2013, Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations.

4. Kwolek-Mirek, M., et Zadrag-Tecza, R., Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells, *FEMS Yeast Research*, 2014, vol. 14, p. 1068-1079. DOI : 10.1111-1567-1364.12202.

5. Guzzon, R. et Larcher, R., The application of flow cytometry in microbiological monitoring during winemaking: two case studies, *Annals of Microbiology*, 2015, vol. 65, p. 1865-1878. DOI : 10.1007/s13213-014-1025-6.

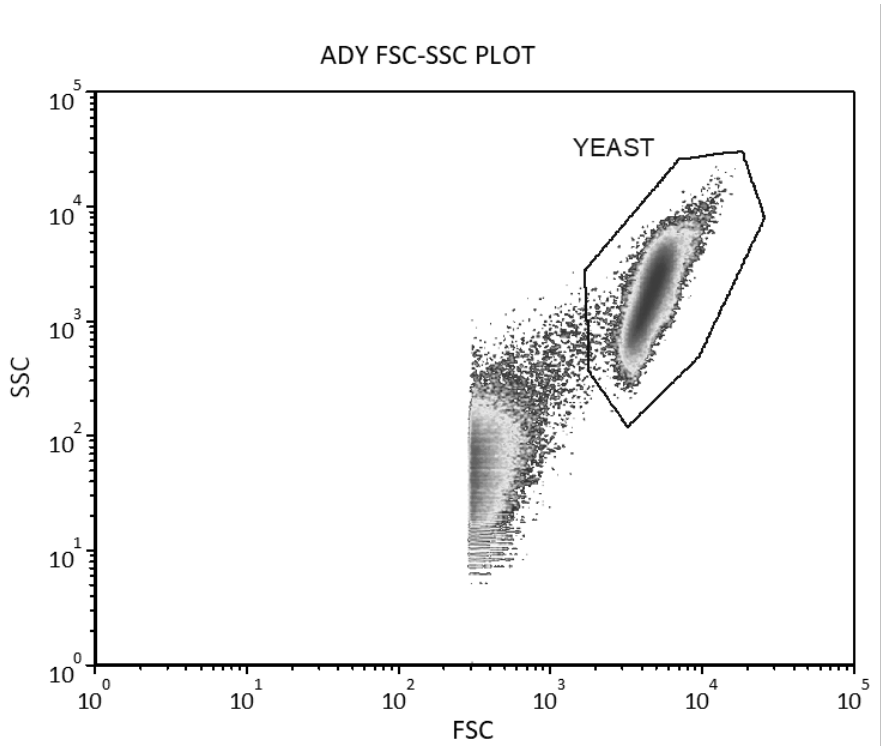


Figure 1. Graphique par points FSC/SSC montrant la fenêtre d'acquisition de la population d'événements correspondant aux cellules de S. cerevisiae (YEAST) présentes dans un échantillon à une concentration de 10^5 cellules/mL.

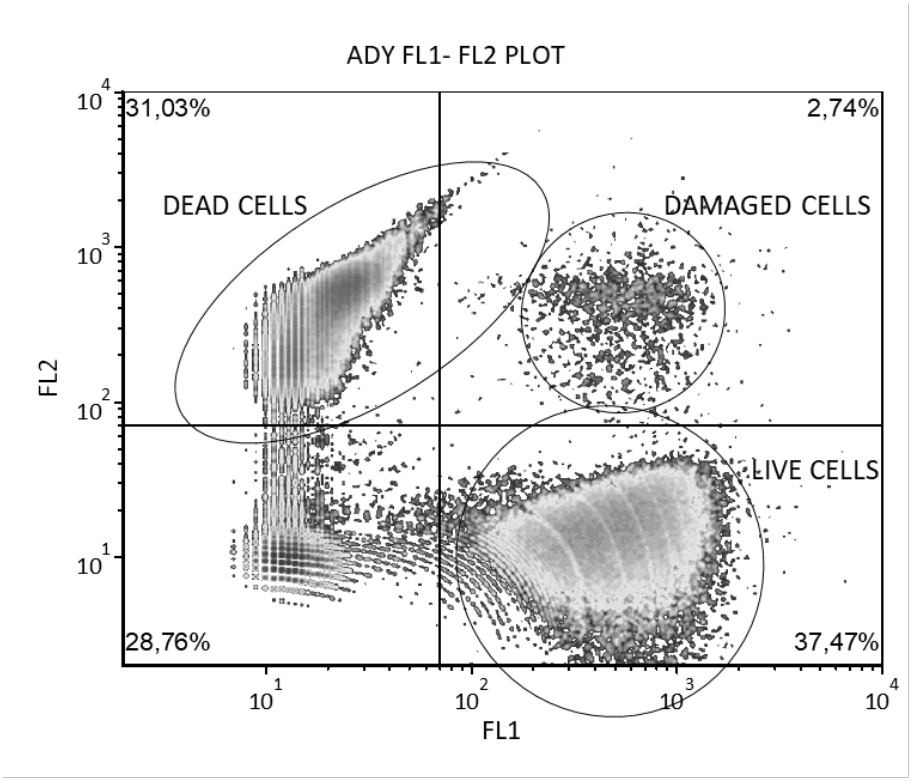


Figure 2. Graphique par points FL1 (530 nm)/FL2 (630 nm) montrant les fenêtres d'acquisition contenant la population d'évènements correspondant aux cellules de S. cerevisiae vivantes (LIVE), mortes (DEAD) et stressées, mais viables (DAMAGED).

DOSAGE DU ZINC PAR SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (Oeno 18/2003)

1 .PRINCIPE

Le zinc est dosé directement par spectrométrie d'absorption atomique en flamme

2. APPAREILLAGE

Paramètres instrumentaux: (donnés à titre d'exemple)

spectrophotomètre d'absorption atomique
flamme air-acétylène oxydante
longueur d'onde: 213,9 nm
lampe à cathode creuse (zinc)
largeur de fente: 0,5 nm
intensité de la lampe : 3,5 mA
correction de l'absorption non spécifique avec une lampe au deutérium.

3. RÉACTIFS

3.1 Eau déminéralisée pure pour analyse

3.2 Acide nitrique pur pour analyse à 65 %

3.3 Solution mère de zinc à 1 g/l du commerce ou préparée de la manière suivante : dissoudre 4,5497 g de $Zn(NO_3)_2.6H_2O$ dans une solution de HNO_3 0,5 M, ajuster à 1 l avec HNO_3 0,5 M.

3.4 Solution de zinc à 10 mg/l :

placer 1 ml de solution mère de zinc dans une fiole jaugée de 100 ml, 1 ml d'acide nitrique (3.2) et compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

3.5 Gamme d'étalonnage: 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 mg/l : placer successivement 1, 2, 3, 4, 5 ml de la solution de zinc à 10 mg/l dans 5 fioles jaugées de 50 ml, compléter au volume avec de l'eau déminéralisée pure pour analyse.

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons liquides ou en solution doivent avoir des concentrations comprises entre 0 et 1 mg/l de zinc.

Les échantillons solides seront minéralisés par voie sèche.

Le blanc est constitué par de l'eau pure pour analyse contenant 1 % d'acide nitrique à 65 %.

5. MODE OPERATOIRE

Passer successivement le blanc, les solutions d'étalonnage et les échantillons de produits œnologiques.

la lecture des absorbances est faite pendant 10 secondes et les mesures sont faites en double.

Les concentrations en zinc des échantillons sont obtenues à partir des valeurs des absorbances.

Chapitre III

Réactifs et solutions titrées employés dans les essais des produits utilisés en œnologie

Liste des réactifs et solutions titrées [30] Mention (R) [31] (Oeno 19/2003)

Acétique	acide cristallisable 98-100% acide dilué (10 p. 100 m/m) acétate neutre de plomb (voir Plomb) acétate de potassium (voir Potassium) acétate de sodium (voir Sodium) acétate d'uranyle et de magnésium
Amidon	empois (sol. aqueuse à 5 g/l)
Ammonium	hydroxyde solution concentrée (20% NH_3 , d(20/4)=0,92 hydroxyde solution diluée (10 g sol. concentrée / 100 g) Hydroxyde solution aqueuse environ 5 M chlorure solution à 20 p. 100 (m/m) citrate solution oxalate solution à 4 p. 100 (m/m) persulfate solution à 15 p. 100 (m/m)
Aniline	réactif
Argent	nitrate (99,5%) nitrate solution à 5 p. 100 (m/m) (R1) nitrate solution à 1 p. 100 (m/m) (R2) nitrate solution ammoniacale
Baryum	chlorure $BaCl_2.2H_2O$ solution à 10 p.100 (m/m)
Bore	acide borique H_3BO_3 99% acide borique solution concentrée à 4 p. 100 (m/v)

[30] cette liste ne comporte pas les solutions titrées d'acides, d'hydroxyde de sodium, d'iode, de nitrate d'argent, etc.

[31] La composition des réactifs « (R As) » est indiquée à propos du dosage de l'arsenic.

Brome	Br_2 (d(20/4)=3,12) eau de brome
Bromophénol	(bleu de) tétrabromophénolsulfonephtaléine (bleu de) solution alcoolique
Bromothymol	(bleu de) dibromothymolsulfonephtaléine (bleu de) solution alcoolique
Bromocrésol	(vert de) tétrabromo-m-crésol-sulfonephtaléine (vert de) solution alcoolique (vert de) et rouge de méthyle en solution (indicateur mixte)
Calcium	acétate solution aqueuse à 25 p.100 (m/v) chlorure solution saturée chlorure solution à 20 p. 100 (m/v) hydroxyde (lait de chaux) sulfate solution saturée
Catalyseur de minéralisation	
Chloramine T	solution à 1 p. 100 (m/v)
Chlore	acide chlorhydrique concentré 35% (d(20/4)=1,19) acide chlorhydrique dilué à 30 p. 100 (v/v) acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (m/m) acide chlorhydrique dilué à 10 p. 100 (v/v) dichromate de potassium (voir Potassium)
Chrome	dichromate de potassium (voir Potassium)
Chromotropique acide	sel sodique sel sodique solution
Citrique acide	monohydraté 99% solution aqueuse à 21 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 20 p. 100 (m/v) solution aqueuse à 10 p. 100 (m/v)

Citrique acide	solution aqueuse à 5 p. 100 (m/v) solution aqueuse 0,033 M solution chlorhydrique solution ajustée à pH 3
Cobalt	chlorure $CoCl_2.6H_20$ solution aqueuse à 5 p. 100 (m/m)
Cuivre	sulfate $CuSO_4.5H_2O$ sulfate, solution à 1 g de cuivre par litre sulfate solution à 0,01 g de cuivre par litre solution ammoniacale de sulfate de cuivre(II) réactif cupro-alcalin
Dichlorophénolindophénol	sel sodique de la 2,6-dichloro-N-(4-hydroxyphényl)-1,4-benzoquinone monoimine dihydraté solution aqueuse à 0,5 g par litre
Diphénylcarbazide	1,5-diphénylcarbonodihydrazide à 0,5 g par litre de solution alcoolique à 95% vol.
Dithizone	1,5-diphénylthiocarbazone solution à 0,5 g/l dans le chloroforme. préparation extemporanée.
Eau oxygénée	(voir peroxyde d'hydrogène)
Fer	sulfate de fer(II) $FeSO_4.7H_2O$ 99% solution de sulfate de fer(II) à 5 p. 100 (m/m) sulfate de fer(II) et d'ammonium $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 98,5% solution de sulfate de fer(II) et d'ammonium à 10 p. 100 (m/m) sulfate de fer(III) $Fe_2(SO_4)_3.7H_2O$ solution à 0,01 g de fer(III) par litre
Formaldéhyde	solution aqueuse à 35 p. 100 (m/m)

Fuchsine basique	mélange de chlorhydrate de rosaniline et de chlorhydrate de pararosaniline. Solution décolorée par le dioxyde de soufre
Hydrazine	dichlorhydrate solution aqueuse
Hydrogène peroxyde	solution concentrée à 30 p. 100 (m/m) (=110 volumes) solution diluée à 3 p.100 (m/m) (=10 volumes)
Iode	99,5% eau iodée
Indigo-sulfonate de sodium	(voir Sodium)
Indicateur mixte Magnésium	(voir rouge de méthyle) chlorure $MgCl_2.6H_2O$ 99% mixture magnésienne
Mercure	oxyde de mercure(II), oxyde jaune de mercure 99% Solution de sulfate de mercure(II) à %
Métaphénylène-diamine	(voir m-phénylènediamine)
Méthyle (rouge de)	(voir rouge de méthyle)
Méthylorange	4' (diméthylamino)azobenzène-4-sulfonate de sodium. Solution alcoolique de méthylorange à 1 p. 100 (m/v)
Molybdène	Réactif (voir Nitrique)
Naphtol	β-naphtol (2-naphtol) solution à 5 p. 100 (m/m)
Nitrique	acide concentré 63% acide dilué à 10 p. 100 (m/m) réactif nitromolybdique

Nitrique	réactif nitro-vanadomolybdique nitrate de plomb (voir Plomb)
Noir ériochrome T	mordant noir 11 solution à 0,2 p. 100 (m/v) dans la triéthanolamine
Oxalique	acide $C_2O_4H_2.2\ H_2O$ 99% solution aqueuse à 5 p. 100 (m/m)
m-Phénylènediamine	dichlorhydrate $C_6H_8N_2.3HCl$ 99%
Phénol (rouge de)	(voir Rouge de phénol)
Phénolphtaléine	solution de phénolphtaléine à 1 p. 100 dans l'alcool (m/v)
Phosphore	acide phosphorique concentré (acide orthophosphorique) 85% d(20/4) = 1,70 solution diluée d'acide phosphorique à 50 p. 100 (m/m) solution diluée d'acide phosphorique à 25 p. 100 (m/v)
Phosphore	dihydrogenophosphate (voir Potassium)
Plomb	acétate neutre de plomb $C_4H_6O_4Pb.3H_2O$ solution aqueuse à 10 p. 100 (m/m) (dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone) nitrate $Pb(NO_3)_2$ 99% solution aqueuse de nitrate de plomb à 1 g de plomb par litre solution aqueuse de nitrate de plomb à 0,01 g de plomb par litre
Potassium	acétate $C_2H_3KO_2$ 99% solution aqueuse à 5 p. 100 (m/m) anhydrosulfite $K_2S_2O_5$ (disulfite) 94% exempt de sélénium solution aqueuse d'anhydrosulfite de potassium à 2 p. 100 (m/m)

Potassium	cyanure KCN 98% solution aqueuse à 10 g p. 100 ml solution aqueuse de cyanure de potassium à 1 mg d'acide cyanhydrique par litre dichromate $K_2Cr_2O_7$ 99% solution aqueuse 10 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 1 g de chrome par litre solution aqueuse à 0,01 g de chrome par litre dihydrogénophosphate H_2KPO_4 99% solution aqueuse à 0,05 g de phosphore par litre hexacyanoferrate(II) $K_4Fe(CN)_6.3\ H_2O$ 98% solution aqueuse à 5 p. 100 (m/m) hydroxyde KOH 85% solution aqueuse à 40%(m/m) ; d(20/4) = 1,38 iodure KI 99% solution d'iodure de potassium iodée permanganate $KMn0_4$ 99% solution aqueuse à 5 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 3 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 2 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 1 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 0,5 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 0,2 p. 100 (m/m) solution phosphorique de permanganate de potassium solution aqueuse saturée thiocyanate KSCN 99% solution aqueuse à 5 p. 100 (m/m)
Pyridine-pyrazolone	réactif
Quinine	sulfate $C_{40}H_{48}N_4O_4.H_2SO_4.2\ H_2O$ 99% solution sulfurique de sulfate de quinine à 0,1 mg par litre d'acide suflurique 0,05 M
Rosaniline	chlorhydrate (voir fuschsine) solution aqueuse à 0,1 g p. 100 ml.

Rouge de méthyle	acide 4-diméthylamino-2-phénylazobenzoïque solution alcoolique de rouge de méthyle indicateur mixte au rouge de méthyle
Rouge de phénol	phénolsulfonephtaléine 98% solution de rouge de phénol
Sélénium	dioxyde S_eO_2 99% solution aqueuse à 100 mg de sélénium par L.
Sodium	acétate $C_2H_3NaO_2.3\ H_2O$ solution aqueuse à 10% (m/m) borate (tétraborate) $Na_2B_4O_7.10\ H_2O$ 99% solution aqueuse saturée Carbonate décahydraté $Na_2CO_3.10\ H_2O$ 99% solution aqueuse à 25 p. 100 (m/m) diéthyldithiocarbamate $C_5H_{10}NS_2Na.3\ H_2O$ 99% sol. alcoolique à 1 p. 100 (m/v) éthylènediaminetétracétate (édétate disodique) $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2\ H_2O$ 98,5% solution aqueuse 0,01 M fluorure NaF 98,5 % solution aqueuse à 4 p. 100 (m/m) hydroxyde solution concentrée (lessive de soude) à 30 p. 100 (m/m) ; d(20/4) = 1,33 solution aqueuse diluée d'hydroxyde de sodium à 10 p. 100 (m/m) hydrogénophosphate (phosphate disodique dihydraté) $HNa_2PO_4.2\ H_2O$ 99,5% solution aqueuse à 10 p. 100 (m/m) pyrophosphate $Na_4P_2O_7.10\ H_2O$ (tétrasodium diphosphate décahydraté) 98% solution aqueuse à 1 p. 100 (m/m) thiosulfate $Na_2S_2O_3.5\ H_2O$ 99% Solution aqueuse à 25 p. 100 (m/v) indigo-sulfonate disodique (carmin d' indigo) solution de carmin d'indigo

Sulfhydrique	acide solution aqueuse saturée acide solution aqueuse à 1 g de soufre par litre acide solution aqueuse à 0,01 g de soufre par litre
Sulforésorcinique	réactif
Sulfurique	acide concentré 95% d(20/4)=1,83 acide concentré 97% (m/m) solution aqueuse à 25 p. 100 (m/m) solution aqueuse diluée à 10 p. 100 (m/m) solution aqueuse diluée à 5 p. 100 (m/m) acide exempt d'azote
Tampons	acétate purifié (recherche du zinc) ammoniacal pH 7,5
Tanin	définition solution aqueuse à 2 p. 100 (m/m) solution aqueuse à 4 p. 100 (m/v) solution aqueuse à 10 p. 100 (m/m)
Thioacétamide	réactif
Uranyle	nitrate $UO_2(NO_3)_2.6\ H_2O$ 99% solution aqueuse à 4 p. 100 (m/m) acétate d'uranyle $UO_2(CH_3COO)_2.2\ H_2O$ 99% solution d'acétate d'uranyle et d'acétate de magnésium
Vert de bromocrésol	(voir Bromocrésol)
Vert de bromocrésol et rouge de méthyle	(voir Bromocrésol)
Zinc	solution 1 mg par litre

RÉACTIFS ET SOLUTIONS TITRÉES

Acétique (acide) cristallisable

ρ_{20}= 1,051; contient au minimum 98,0 p. 100 (m/m) de $C_2H_4O_2$.

Acétique (acide) dilué

Solution aqueuse contenant 10 g environ d'acide acétique dans 100 g de réactif.

ρ_{20}= 1,0125 environ.

Amidon (empois d') à 0,5 p. 100 (m/v)

Dans un mortier, broyer 2,5 g d'amidon soluble et 10 mg d'iodure de mercure(II) avec ce qu'il faut d'eau pour obtenir une bouillie fluide. Introduire cette dernière dans 500 ml d'eau en pleine ébullition que l'on maintient 10 minutes. Le liquide obtenu est limpide. Au besoin, filtrer.

Hydroxyde d'ammonium solution concentrée

ρ_{20}= 0,922.

Solution aqueuse concentrée de gaz ammoniac contenant 20 g environ d'ammoniac (NH_3) dans 100 g de réactif.

Hydroxyde d'ammonium solution diluée

Solution aqueuse de gaz ammoniac, contenant 10 g environ d'ammoniac (NH_3) dans 100 g de réactif.

ρ_{20}= 0,959 environ.

Ammonium (chlorure d') en solution

Solution aqueuse contenant 20 g de chlorure d'ammonium dans 100 g de réactif.

Ammonium (citrate d') en solution

Verser lentement 500 ml de solution concentrée d'hydroxyde d'ammonium (R) sur 400 g d'acide citrique placés dans une fiole jaugée de 1000 ml. La masse s'échauffe et la dissolution s'effectue. Après refroidissement, compléter le volume de 1000 ml avec de l'hydroxyde d'ammonium concentré (R).

Ammonium (hydroxyde d') en solution environ 5 M

Diluer 460 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (ρ_{20}= 0,922) avec une quantité suffisante d'eau pour obtenir 1 l.

Ammonium (oxalate d') en solution à 4% (m/m)

Solution aqueuse contenant 4 g d'oxalate diammonique dans 100 g de solution.

Ammonium (persulfate d') en solution à 15% (m/m)

Solution aqueuse contenant 15 g de persulfate d'ammonium pour 100 g de solution.

Aniline

$C_6H_5NH_2$ = 93,1.

Le produit employé comme réactif doit être limpide, à peine jaune.

ρ_{20}= 1,020 à 1,023.

A la distillation, 95 %. au minimum doivent passer entre 183°C et 185°C.

Argent (nitrate d') en solution à 5% (m/m)

Solution aqueuse contenant 5 g de nitrate d'argent desséché pour 100 g de réactif.

Argent (nitrate d') en solution à 1% (m/m)

Solution aqueuse contenant 1 g de nitrate d'argent desséché pour 100 g de réactif.

Argent (nitrate d') en solution ammoniacale

Solution ammoniacale préparée avec 10 g de nitrate d'argent desséché pour 100 g environ de réactif.

Dans 30 g d'eau distillée, faire dissoudre 5 g de nitrate d'argent desséché. Verser dans cette solution, goutte à goutte et avec précaution, la solution d'hydroxyde d'ammonium diluée (R) jusqu'à redissolution presque complète de l'oxyde d'argent précipité. Compléter à 50 ml, filtrer et conserver le réactif à l'abri de la lumière dans un flacon muni d'un bouchon de verre.

Baryum (chlorure de) en solution à 10% (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g de $BaCl_2.2H_2O$, pour 100 g de réactif.

Borique (acide) concentré en solution à 40 g par litre

Cet acide doit être pur, entièrement soluble dans l'eau (résidu insoluble inférieur à 50 mg pour 1 kg) et ne pas brunir pendant son incinération (absence de matières organiques).

La solution aqueuse à 40 g pour 1 l de solution doit être neutre au méthylorange. La coloration orangée de cet indicateur doit être obtenue par moins de 3 ml de solution d'acide chlorhydrique 0,1 M pour 1 l de cette solution à 40 g par litre.

Un acide borique qui ne répondrait pas à ces essais peut être purifié par filtration à chaud d'une solution saturée bouillante d'acide borique (à 350 g par litre d'eau environ) et cristallisation par refroidissement.

Préparer une solution à 40 g de cet acide concentré pour 1 l de solution.

Brome (eau de)

Solution aqueuse saturée de brome, contenant environ 3,5 g de brome pour 100 ml à 20°C.

Bleu de bromophénol en solution

Solution dans l'alcool à 95 % vol. contenant 0,04 g de bleu de bromophénol dans 100 ml au total.

Bleu de bromothymol en solution

Solution dans l'alcool à 95 % vol. contenant 0,04 g de bleu de bromothymol dans 100 ml au total.

Calcium (acétate de) à 25% (m/v)

Solution aqueuse d'acétate de calcium à 25 g pour 100 ml.

Calcium (acétate de) en solution pH 6

Dans un vase cylindrique, placer :

- carbonate de calcium 10 g
- acide acétique 12 g
- eau 100 ml

Chauffer jusqu'à dissolution, ajuster le pH à 6 et ajuster à 1 l.

Calcium (chlorure de) en solution saturée

Elle contient environ 80 g de $CaCl_2.6H_2O$ pour 100 g de solution.

Calcium (chlorure de) en solution à 20% (m/v)

Solution aqueuse contenant 20 g de chlorure de calcium cristallisé, $CaCl_2.6H_2O$ dans 100 ml de réactif.

Calcium hydroxyde (lait de chaux) à 10% (m/m)

La suspension d'hydroxyde de calcium (lait de chaux) est obtenue en traitant 10 g d'oxyde de calcium (chaux vive) par 90 g environ d'eau bouillante.

Calcium (sulfate de) en solution saturée

Solution aqueuse saturée; elle contient environ 0,2 g de $CaSO_4$ pour 100 g.

Catalyseur de minéralisation

Pulvériser et mélanger :

- sélénium 2,5 g
- sulfate de cuivre(II) 5 g
- sulfate dipotassique 100 g

Chloramine T solution à 1% (m/v)

Solution aqueuse contenant 1 g de chloramine T (sel de sodium du *p*-toluène N-chlorosulfamide) pour 100 ml de réactif.

Chlorhydrique (acide) concentré

Solution aqueuse d'acide chlorhydrique (ρ_{20}= 1,18 à 1,19) contenant 35,5 à 37,25 g d'acide chlorhydrique (HCl) dans 100 g ou 100 ml.

Chlorhydrique (acide) dilué à 30% (v/v)

Diluer 300 ml d'acide chlorhydrique concentré (ρ_{20}= 1,19) avec une quantité d'eau suffisante pour obtenir 1 l.

Cette solution contient 13 g environ de HCl pour 100 ml.

Chlorhydrique (acide) dilué à 10% (m/m) (ρ_{20}= 1,0489)

Solution aqueuse contenant 10 g de gaz chlorhydrique (HCl) dans 100 g.

Chlorhydrique (acide) dilué à 10% (v/v)

Solution aqueuse d'acide chlorhydrique contenant 10 ml environ d'acide chlorhydrique concentré (R) dans 100 ml, soit environ 3,6 g HCl pour 100 ml.

Chromotropique (acide)

Acide 1,8-dihydroxy-3,6-naphtalène-1,6-disulfonique ($C_{10}H_8O_8S_2,2H_2O$ = 356,3).

Poudre blanche brunissant à la lumière, soluble dans l'eau. On emploie également le sel disodique de cet acide qui se présente sous forme d'un produit jaune ou brun clair, très soluble dans l'eau.

Solution d'acide chromotropique (sel sodique) à 0,05% (m/v)

Dissoudre 60 mg du sel de sodium de l'acide chromotropique dans 80 ml environ d'eau, compléter à 100 ml avec de l'eau. Utilisation dans les 24 heures.

Citrique (acide) en solution à 21% (m/m)

Solution aqueuse à 21 g pour 100 g.

Citrique (acide) en solution à 20% (m/v)

Solution aqueuse d'acide citrique à 20 g pour 100 ml.

Citrique (acide) en solution à 10% (m/v)

Solution aqueuse d'acide citrique à 10 g pour 100 ml.

Citrique (acide) en solution à 5% (m/v)

Solution aqueuse d'acide citrique à 5 g pour 100 ml.

Citrique (acide) en solution 0,033 M

Solution contenant exactement un dixième d'équivalent gramme d'acide citrique monohydraté par litre (soit 7,003 g par litre).

Citrique (acide) en solution chlorhydrique

Dissoudre 150 g d'acide citrique monohydraté concentré dans 800 ml d'eau ; ajouter 100 ml d'acide chlorhydrique concentré et ajouter le volume à 1 l.

Citrique (acide) en solution à 5 g par litre ajustée à pH 3

Dissoudre 5 g d'acide citrique dans 900 ml d'eau. Ajouter 8 ml de solution d'hydroxyde de sodium 1 M et ajuster 1 l.

Cobalt (chlorure de) en solution à 5% (m/m)

Solution contenant 5 g de chlorure de cobalt $CoCl_2.6H_2O$ dans 100 g de réactif.

Cuivre(II) (sulfate de) solution à 1 g et 0,01 g par litre

La solution aqueuse à 1 g de cuivre par litre contient 3,9295 g de sulfate de cuivre ($CuSO_4.5H_2O$) et 1 ml d'acide sulfurique concentré par litre.

Cette solution est diluée au centième pour obtenir la solution à 0,01 g de cuivre par litre.

Cuivre (sulfate de) en solution ammoniacale

Sulfate de cuivre $CuSO_4.5H_2O$	5 g
Eau	500 ml
Hydroxyde d'ammonium concentré (R)	300 ml

Dissoudre le sulfate de cuivre dans l'eau. Ajouter l'hydroxyde d'ammonium et homogénéiser.

Cupro-alcalin (réactif)

Le réactif cupro-alcalin titré contient pour 1000 ml :

Cuivre, Cu	4,454 g

Il est obtenu par le mélange de deux solutions :

a) Solution de cuivre(II), (C)

Peser exactement 35 g de sulfate de cuivre (R) et l'introduire dans une fiole jaugée de 1000 ml avec 500 ml environ d'eau distillée et 5 ml d'acide sulfurique concentré (R). Agiter pour dissoudre et compléter à 20°C avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Mélanger.

b) Solution tartrique alcaline, (T)

Peser 150 g de L-tartrate de potassium et de sodium (R) et les introduire dans une fiole jaugée de 1000 ml contenant 500 ml environ d'eau distillée chaude. Agiter pour dissoudre. Laisser refroidir et ajouter 300 ml de solution concentrée d'hydroxyde de sodium (R) non carbonatée.

Compléter à 20°C, avec de l'eau distillée, le volume de 1000 ml de solution. Mélanger.

10 ml de la solution C additionnés de 10 ml de la solution T sont réduits à l'ébullition par 0,05 g de sucre interverti, par 0,048 g de glucose pur et par 0,0695 g de lactose anhydre ou par 0,073 g de lactose hydraté.

2,6-dichlorophénolindophénol en solution

Dissoudre 0,50 g de 2,6-dichlorophénolindophénol dans 200 ml d'eau chauffée à 90°C. Laisser refroidir et compléter à 1000 ml avec de l'eau. Filtrer.

Diphénylcarbazide en solution

Solution de 0,50 g de diphénylcarbazide dans 1 l d'alcool à 95 % vol.

Eau oxygénée en solution diluée

Voir Hydrogène (peroxyde d').

Fer(II) (sulfate) en solution à 5 p. 100 (m/m)

Solution préparée extemporanément avec de l'eau distillée bouillie, contenant 5 g de sulfate de fer(II) $FeSO_4.7H_2O$ dans 100 g de réactif (l'air l'oxyde rapidement).

Fer(III) (sulfate) en solution saturée

Préparer une solution saturée de sulfate de fer(III) $Fe_2(SO_4)_3.7H_2O$.

Fer(II) (et ammonium sulfate) en solution à 10 p. 100 (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g de sulfate de fer(II) et d'ammonium dans 100 g de réactif.

Fer(III) (sel) en solution à 0,010 g de fer par litre

Dissoudre 0,1 g de fer pur dans 20 ml d'eau et 5 ml de H_2SO_4 concentré (R). Chauffer, ajouter 10 gouttes de HNO_3 concentré (R) et porter à ébullition 10 minutes pour peroxyder le fer. Ajuster le volume à 1 l. Diluer 1/10.

Formaldéhyde en solution

Solution aqueuse renfermant 35 p. 100 (m/m) de formaldéhyde.

Fuchsine décolorée par l'acide sulfureux

8 g d'anhydrosulfite de potassium sont dissous dans 150 ml d'eau distillée; ajouter 30 ml d'une solution de fuchsine basique à 1 p. 1000 (m/v) dans l'alcool à 95 % vol. et 55 ml d'acide chlorhydrique 3 M. Compléter à 250 ml avec de l'eau distillée. Conserver en flacon jaune bouché à l'émeri.

Hydrazine (dichlorhydrate d') en solution

Dichlorhydrate d'hydrazine		500 mg
Eau	q.s.p.	100 ml

Dissoudre le dichlorhydrate d'hydrazine dans environ 80 ml d'eau, puis ajuster le volume à 100 ml.

Réactif à préparer extemporanément.

Hydrogène (peroxyde d') en solution à 3 volumes

Cette solution contient 9,1 g de H_2O_2 par litre; elle libère 3 fois son volume d'oxygène par décomposition catalytique par MnO_2 en milieu alcalin.

Iodée (eau)

Solution aqueuse saturée d'iode.

Indigo-sulfonate de sodium

Sel de sodium de l'indigo-disulfoné (improprement appelé carmin d'indigo): $C_{16}H_8O_8S_2N_2Na_2$

Ce produit en solution à 10 p. 100 (m/v) doit virer au jaune lorsqu'on l'oxyde par le permanganate de potassium en milieu sulfurique; 50 ml de cette solution nécessitent de 14 à 17 ml de solution 0,02 M de permanganate de potassium.

Si, par oxydation permanganique, cette solution ne vire pas au jaune, il convient de purifier l'indigo-sulfonate de sodium par le procédé suivant :

Mettre 10 g d'indigo-sulfonate de sodium en contact avec 50 ml d'acide sulfurique concentré (R). Au bout de deux jours, ajouter 100 ml d'eau; le lendemain, filtrer. Rejeter le filtrat de couleur rouille. Reprendre le résidu par 100 ml d'eau, rejeter encore le filtrat.

Dissoudre le résidu par 800 à 1000 ml d'eau acidulée par 5 ml d'acide sulfurique concentré (R).

Solution de carmin d'indigo : Dissoudre 0,2 de carmin d'indigo dans un mélange de 10 ml d'acide chlorhydrique R et de 990 ml de solution d'acide sulfurique exempt d'azote R à 200 g par litre.

Magnésium (chlorure) en solution 0,01 M

Dissoudre 0,45 g d'oxyde de magnésium pur MnO_2 dans la quantité nécessaire d'acide chlorhydrique dilué (R). Porter au litre. Titrer cette solution au moyen de la solution 0,01 M d'éthylènediaminetétracétate de sodium en présence de noir ériochrome T.

Magnésienne (mixture)

Dissoudre 82 g de chlorure de magnésium ($MgCl_2.6H_2O$) et 100 g de chlorure d'ammonium dans 800 ml d'eau. Ajouter 400 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (ρ_{20} = 0,92) (R). Mélanger.

Mercure(II) (sulfate) en solution acide

Solution aqueuse et acide de sulfate de mercure(II) $HgSO_4$. Dans une fiole jaugée de 200 ml, introduire 10 g d'oxyde jaune de mercure, 120 ml d'eau et 75 g d'acide sulfurique concentré (R) (40 ml). Après refroidissement, ajuster le volume à 200 ml.

Métaphénylène-diamine (chlorhydrate de)

Poudre amorphe gris-mauve : $C_6H_8N_2$, 2 HCl.

Méthylorange en solution

Solution préparée avec l'alcool à 90 % vol. contenant 1 g de méthylorange dans 100 ml de réactif.

β-naphtol en solution à 5% (m/m)

Dissoudre 5 g de β-naphtol dans 40 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium concentrée (R) et ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau distillée. Préparer extemporanément.

Nitrique (acide) concentré

$\rho 20 = 1{,}39$

L'acide nitrique concentré contient environ 63 p. 100 d'acide nitrique (HNO_3).

Nitrique (acide) dilué

$\rho 20 = 1{,}056$

Solution contenant 10 g environ d'acide nitrique (HNO_3) dans 100 g de réactif préparée avec 15,8 g d'acide nitrique (11,35 ml) ($\rho 20 = 1{,}39$) à 63 g pour 100 g et 84,2 g d'eau.

Nitromolybdique (réactif)

Dissoudre 60 g de molybdate d'ammonium dans 200 g d'eau tiède. Filtrer si nécessaire. Verser peu à peu cette solution dans 720 g d'acide nitrique dilué, en agitant constamment ce dernier. Cet acide dilué est obtenu en mélangeant 370 g d'acide nitrique concentré (R) avec 350 g d'eau. Laisser reposer 8 jours. Ajuster le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée. Filtrer ou décanter.

Ce réactif, chauffé à 40 °C, ne doit pas laisser déposer de précipité.

Sensibilité : 25 µg de phosphore pour 5 ml.

Nitro-vanado-molybdique (réactif)

Préparer les solutions suivantes

A) Solution de molybdate d'ammonium		
Molybdate d'ammonium	100 g	
Hydroxyde d'ammonium concentré (R)	10 ml	
Eau distillée,		q.s.p.1000 ml
B) Solution de vanadate d'ammonium		
Métavanadate d'ammonium	2,35 g	
Eau distillée	500 ml	

Chauffer légèrement pour dissoudre. Après dissolution complète, refroidir et ajouter peu à peu, en agitant le mélange suivant :

Acide nitrique concentré (R) 7 ml
Eau distillée 13 ml

Compléter avec de l'eau distillée le volume de 1000 ml. Mélanger.

Pour obtenir le réactif nitro-vanado-molybdique, mélanger dans une fiole jaugée de 500 ml, 67 ml d'acide nitrique concentré (R), 100 ml de la solution molybdique (A), 100 ml de la solution nitro-vanadique (B) et ajuster le volume à 500 ml. Mélanger.

Noir ériochrome T en solution

Solution renfermant 0,2 g de noir ériochrome T dans 100 ml de triéthanolamine.

Oxalique (acide) en solution

Solution aqueuse contenant 5 g d'acide oxalique cristallisé $C_2O_4H_2.2H_2O$, dans 100 g de réactif.

Phénolphtaléine en solution

Solution préparée avec l'alcool à 90 % vol. contenant 1 g de phénolphtaléine dans 100 ml de réactif.

Phosphorique (acide) solution à 85% (m/m)

Solution aqueuse contenant 85 g d'acide orthophosphorique (H_3PO_4), ρ_{20} = 1,70, pour 100 g.

Phosphorique (acide) solution à 25% (m/v)

Solution aqueuse contenant 25 g d'acide phosphorique (H_3PO_4), ρ_{20} = 1,70, dans 100 ml.

Phosphorique (acide) solution à 50% (m/m)

Solution aqueuse contenant 50 g d'acide orthophosphorique (H_3PO_4), ρ_{20} = 1,70 dans 100 g.

Phosphate (solution à 0,05 g de phosphore par litre)

Potassium dihydrogénophosphate

Dissoudre 4,392 g de phosphate monopotassique (KH_2PO4) dans une quantité d'eau suffisante pour obtenir 1 l. Cette solution contient 1 g de

phosphore par litre. Diluer au vingtième pour obtenir la solution à 0,05 g par litre.

Plomb (nitrate de) en solution à 1 g et à 0,01 g de plomb par litre

Dissoudre 1,60 g de nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$ dans une quantité d'eau suffisante pour obtenir 1 l de solution à 1 g de plomb par litre. Cette solution est diluée au centième pour obtenir la solution à 0,01 g de plomb par litre.

Plomb (acétate neutre de) en solution à 10% (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g d'acétate de plomb (II) $PbC_4H_6O_4.3H_2O$ dans 100 g de réactif.

Potassium (acétate de) en solution à 5% (m/m)

Solution aqueuse contenant 5 g d'acétate de potassium $KC_2H_3O_2$ cristallisé dans 100 g de réactif CH_3CO_2K.

Potassium sulfite

Potassium (anhydrosulfite de) $K_2S_2O_5$ (anciennement disulfite de potassium) exempt de sélénium.

Pour la recherche du sélénium dans le dioxyde de soufre, il faut utiliser de l'anhydrosulfite de potassium exempt de sélénium. Pour contrôler l'absence de sélénium, procéder à l'essai suivant :

Peser 2,55 g de l'échantillon d'anhydrosulfite de potassium, les dissoudre à chaud dans 7 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (R). Laisser refroidir et ajouter 3 ml de soluté de formaldéhyde (R). Laisser reposer 10 minutes. Placer le tube dans un bain d'eau à 100°C et ajouter 50 mg de l'échantillon d'anhydrosulfite de potassium pulvérisé.
La prise d'essai totale est de 2,60 g d'anhydrosulfite de potassium correspondant à 1,50 g de dioxyde de soufre. Il ne doit pas se développer de coloration rose.

Potassium (anhydrosulfite de) en solution à 2% (m/m)

Solution aqueuse contenant 2 g d'anhydrosulfite de potassium cristallisé dans 100 g de réactif.

Potassium (cyanure de) en solution à 1 mg d'acide cyanhydrique par litre

Préparer une solution aqueuse contenant 2,44 g de KCN par litre, diluer au 1/100 pour obtenir la solution titrant 1 mg d'acide cyanhydrique par litre.

Potassium (dichromate de) à 1 g et 0,01 g de chrome par litre

Dissoudre 2,8283 g de dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$ dans une quantité d'eau suffisante pour obtenir 1 l de solution à 1 g de chrome par litre. Cette solution est diluée au centième pour obtenir la solution à 0,01 g de chrome par litre.

Potassium (dichromate de) en solution à 10% (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g de dichromate de potassium dans 100 g de réactif.

Potassium (hexacyanoferrate(II) de) Potassium (ferrocyanure de) en solution à 5% (m/m)

Solution aqueuse contenant 5 g d'hexacyanoferrate de potassium $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ cristallisé dans 100 g de réactif.

Potassium (hydroxyde de) à 40%

Dissoudre 40 g d'hydroxyde de potassium (KOH) dans une quantité d'eau suffisante pour obtenir 100 ml.

Potassium (iodure de) en solution iodée

Solution iodo-iodurée - solution aqueuse d'iode (I_2) dans l'iodure de potassium (KI).

Dans un flacon taré, muni d'un bouchon de verre, introduire 2 g d'iode, 4 g d'iodure de potassium et environ 10 g d'eau. Laisser la dissolution s'opérer, puis compléter avec de l'eau, le poids de 100 g.

Potassium (permanganate de) en solution à 5% (m/m)

Solution aqueuse contenant 5 g de permanganate de potassium ($KMnO_4$) dans 100 g de réactif.

Potassium (permanganate de) en solution à 3% (m/m)

Solution aqueuse contenant 3 g de permanganate de potassium dans 100 g de réactif.

Potassium (permanganate de) en solution à 2% (m/m)

Solution aqueuse contenant 2 g de permanganate de potassium dans 100 g de réactif.

Potassium (permanganate de) en solution à 1% (m/m)

Solution aqueuse contenant 1 g de permanganate de potassium dans 100 g de réactif.

Potassium (permanganate de) en solution à 0,2% (m/m)

Solution aqueuse contenant 0,2 g de permanganate de potassium dans 100 g de réactif.

Potassium (permanganate de) en solution saturée

Solution aqueuse saturée contenant environ 6 g de permanganate de potassium dans 100 g de réactif.

Potassium (permanganate de) à 5 p. 1000 (m/m)

Solution aqueuse contenant 5 g de permanganate de potassium dans 1000 g de réactif.

Potassium (permanganate de) solution phosphorique

Dissoudre 3 g de permanganate de potassium R dans un mélange de 15 ml d'acide phosphorique R et de 70 ml d'eau ; compléter à 100 ml avec de l'eau.

Potassium (thiocyanate de) en solution à 5% (m/m)

Solution aqueuse contenant 5 g de thiocyanate de potassium KSCN dans 100 g de réactif.

Pyridine-pyrazolone (réactif)

Bis-(*1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone*). (F. 320 °C). - Dissoudre 17,4 g de bis-(1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone dans 100 ml d'alcool à 95 % vol., ajouter 25 g de phénylhydrazine fraîchement distillée, porter à l'ébullition sous reflux pendant 4 heures. Le mélange est filtré chaud et le précipité lavé plusieurs fois avec de l'alcool à 95 % vol.

L'ébullition sous reflux pourra être prolongée au-delà de 4 heures si l'apparition de cristaux jaunes est peu abondante après ce temps.

Préparation du réactif pyridine-pyrazolone. - Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 0,150 g de 1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone et les dissoudre dans 50 ml d'alcool à 95 % vol. distillé sur de l'hydroxyde de potassium, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

D'autre part, peser 20 mg de bis-(1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone), et les dissoudre par agitation prolongée dans 20 ml de pyridine.

Mélanger les deux solutions ainsi obtenues en les versant dans un flacon de verre jaune enveloppé d'un papier noir. Conserver au réfrigérateur.

Quinine (sulfate de) en solution à 0,1 mg par litre d'acide sulfurique 0,05 M

Dissoudre 0,100 g de sulfate de quinine dans une quantité suffisante d'acide sulfurique 0,05 M pour obtenir 1 l. Diluer trois fois 1/10 cette solution avec une solution 0,05 M d'acide sulfurique pour obtenir la solution à 0,1 mg de sulfate de quinine par litre.

Rosaniline (chlorhydrate de) en solution décolorée par l'acide sulfureux

Dans un mortier, pulvériser 30 mg de chlorhydrate de rosaniline pur, puis ajouter 30 ml d'alcool à 95 % vol. La dissolution est rapide et complète. D'autre part, dans une fiole jaugée de 250 ml, dissoudre 8 g d'anhydrosulfite de potassium dans 150 ml environ d'eau distillée. Ajouter la solution alcoolique de chlorhydrate de rosaniline, puis 55 ml de solution 3 M d'acide chlorhydrique et porter au trait de jauge avec de l'eau. Le réactif doit être complètement décoloré en moins d'une heure. Il est stable plusieurs mois.

Rouge de méthyle en solution

Solution dans l'alcool à 90 % vol. contenant 0,10 g de rouge de méthyle dans 50 ml de réactif.

Indicateur mixte au rouge de méthyle :

Solution dans l'alcool à 90% vol. contenant 0,10 g de rouge de méthyle et 0,05 g de bleu de méhtylène dans 10 ml de réactif.

Rouge de phénol en solution

Chauffer 0,05 g de rouge de phénol avec 2,85 ml de solution 0,05 M d'hydroxyde de sodium et 5 ml d'alcool à 90 % vol. A la solution obtenue, ajouter une quantité suffisante d'alcool à 20 % vol. pour obtenir 250 ml.

Sélénium (dioxyde de) en solution à 100 mg de sélénium par litre

Broyer 2 g de dioxyde de sélénium pur (SeO_2) et laisser séjourner 24 heures dans un dessiccateur à acide sulfurique. Peser 1,4553 g de ce dioxyde sec et les dissoudre dans une quantité d'eau suffisante pour obtenir 1 l de solution.

Cette solution contient 1 g de sélénium par litre. Diluer 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir la solution à 100 mg de sélénium par litre.

Sodium (acétate de) – $NaC_2H_3O_2.3H_2O$ = 136,1.

Le sel employé comme réactif doit être neutre.

Sodium (acétate de) en solution à 10% (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g d'acétate de sodium $NaC_2H_3O_2.3H_2O$ dans 100 g de réactif.

Sodium (borate de) en solution saturée

Solution aqueuse saturée contenant environ 4 g de borate de sodium cristallisé, pour 100 g de solution. Sodium tetraborate $Na_2B_4O_7$.

Sodium (carbonate neutre) en solution à 25% (m/m)

Solution aqueuse contenant 25 g de carbonate disodique cristallisé à 10 H_2O dans 100 g de réactif $Na_2CO_3.10H_2O$.

Sodium (diéthyldithiocarbamate de) en solution à 1% (m/v)

Dissoudre 1 g de diéthyldithiocarbamate de sodium dans une quantité suffisante d'alcool à 40 p. 100 vol. pour obtenir 100 ml de solution. $(C_2H_5)_2NCS_2Na.3H_2O$

Sodium (éthylènediaminetétracétate de) en solution 0,01 M

Éthylènediaminetétracétate de sodium	4,0 g
Chlorure de magnésium, $MgCl_2.6H_2O$	0,1 g
Eau	q.s.p. 1000 ml

Le titre de cette solution doit être vérifié et ajusté après titrage par une solution de chlorure de calcium 0,01 M obtenue en dissolvant 1 g de carbonate de calcium pur dans 25 g d'acide chlorhydrique concentré (R) additionné de 20 ml d'eau et en ajustant le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Sodium (fluorure de) en solution à 4% (m/m)

Solution aqueuse contenant 4 g de fluorure de sodium (NaF) dans 100 g de réactif. Cette solution est presque saturée.

Sodium (hydroxyde de) en solution concentrée (lessive de soude)

Solution aqueuse de densité 1,330 contenant 30 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 100 g de solution.

Sodium (hydroxyde de) en solution diluée à 10% (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 100 g de réactif.

Sodium (phosphate de) en solution à 10% (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g de phosphate disodique cristallisé dans 100 g de réactif.

Sodium (pyrophosphate de) à 1% (m/m)

Solution aqueuse contenant 1 g de pyrophosphate tétrasodique cristallisé, $Na_4P_2O_7$, $10H_2O$, dans 100 g de réactif.

Sodium (thiosulfate de) en solution à 25% (m/v)

Solution aqueuse contenant 25 g de thiosulfate de sodium (Na_2S_2O3) pour 100 ml.

Sulfhydrique (acide) en solution saturée

Solution aqueuse saturée d'acide sulfhydrique. Elle contient 3,8 g de H_2S par litre environ. Elle est altérable à l'air.

Sulfhydrique (acide) solution à 1 g de soufre par litre et à 0,01 g par litre

Dissoudre 7,5 g de $Na_2S.9H_2O$ dans une quantité suffisante d'eau pour obtenir 1 l. Cette solution est diluée au centième pour obtenir la solution à 0,01 g par litre (solutions rapidement oxydées par l'air).

Sulforésorcinique (réactif)

Dissoudre 2 g de résorcine pure dans 100 ml d'eau et ajouter 0,5 ml d'acide sulfurique concentré (R).

Sulfurique (acide) concentré à 95% minimum

$\rho 20/4$ = 1,83 à 1,84. (H_2SO_4)

Sulfurique (acide) à 97% (m/m)

Cet acide absolument incolore ne doit pas pouvoir être différencié après chauffage à 120°C d'un témoin non chauffé. Il doit être conservé en flacons bouchant à l'émeri. Son titre doit être de 97 ± 1 p. 100.

Sulfurique (acide) à 25% (m/m)

$\rho 20/4$ = 1,1808 environ.

Solution aqueuse d'acide sulfurique contenant 25 g environ d'acide H_2SO_4 dans 100 g de réactif.

Sulfurique (acide) dilué à 10% (m/m)

$\rho 20/4$ = 1,0682 environ.

Solution aqueuse d'acide sulfurique contenant 10 g environ d'acide H_2SO_4 dans 100 g de réactif.

Sulfurique (acide) dilué à 5% (m/m)

Solution aqueuse d'acide sulfurique contenant 5 g environ d'acide H_2SO_4 dans 100 g de réactif.

Sulfurique (acide) exempt d'azote, doit satisfaire à l'essai suivant : Nitrate. A 5 ml d'eau, ajouter, avec précaution, 45 ml d'acide sulfurique exempt d'azote, laisser refroidir à 40°C et ajouter 8 mg de diphénylbenzidine. La solution est faiblement rose ou bleu pâle.

Tampon acétate, purifié, pour la recherche du zinc

Dissoudre 136 g d'acétate de sodium dans 440 ml d'eau, ajouter 58 ml d'acide acétique concentré. Purifier cette solution par agitation avec une solution de dithizone à 125 mg par litre de chloroforme.

Tampon ammoniacal

Hydroxyde d'ammonium concentré	350 ml
Chlorure d'ammonium	54 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Tampon pH 7,5

Phosphate monopotassique	94 g
Hydroxyde de sodium en solution molaire	565 ml
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

Tanin pur

Le tanin, dit tanin à l'éther ou tanin officinal, est retiré de la noix de galle d'Alep.

Il se présente en masse légère, blanc jaunâtre, très soluble dans l'eau et dans l'alcool à 90 % vol. Il est insoluble dans l'éther éthylique. Il doit satisfaire aux essais suivants :

1° La solution aqueuse de tanin à 10 p. 100 doit être limpide et présenter une teinte jaune très peu foncée, comparable à celle du vin blanc. La solution de tanin à 10 p. 100 dans l'alcool à 90 % vol. devra être aussi limpide et peu colorée.

Une solution à 1 g de tanin dans 5 g d'eau étant additionnée de son volume d'alcool à 90 % vol. et de la moitié de son volume d'éther éthylique, doit donner une solution limpide (extrait aqueux ou extrait alcoolique).

2° Le tanin officinal doit être combustible sans laisser de résidu supérieur à 0,05 p. 100 (matières minérales fixes).

3° Desséché à 100°C, le tanin officinal ne doit pas perdre plus de 12 p. 100 de son poids (eau en excès). La teneur en tanin anhydre est déduite

de cet essai. Sa connaissance est nécessaire pour la préparation de la solution à 4 p. 1000.

Tanin en solution à 2% (m/m)

Solution aqueuse contenant 2 g de tanin dans 100 g de réactif. Elle doit être préparée extemporanément.

Tanin en solution à 4% (m/v)

Dissoudre une quantité de tanin pur contenant 1 g de tanin anhydre dans une quantité d'eau suffisante pour obtenir 250 ml.

Tanin en solution à 10% (m/m)

Solution aqueuse contenant 10 g de tanin dans 100 g de réactif.

Thioacétamide (réactif au)

F ≅ 113°C

A 0,2 ml de solution aqueuse de thioacétamide à 40 g/l, ajouter 1 ml d'un mélange de 5 ml d'eau, de 15 ml d'hydroxyde de sodium 1 M et de 20 ml de glycérol à 85 p. 100 (m/m). Chauffer dans un bain d'eau à 100 °C pendant 20 secondes. Préparer extemporanément.

Uranyle (nitrate d') en solution à 4% (m/m)

Solution contenant 4 g de nitrate d'uranyle $UO_2(NO_3)_2.6H_2O$ dans 100 g de réactif.

Uranyle et magnésium (acétates) en solution hydro-alcoolique et acétique

Dissoudre 32 g d'acétate d'uranyle cristallisé et 100 g d'acétate de magnésium dans 300 ml d'eau, 20 ml d'acide acétique et 500 ml d'alcool à 95 % vol. en chauffant sur bain d'eau à 100 °C et en agitant; ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau (distillée) et laisser reposer 48 heures; décanter ou filtrer.

Ce réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. On doit employer 2,5 ml de réactif par milligramme de sodium à précipiter et par millilitre de solution à traiter.

Les phosphates, arséniates et fluorures doivent être absents de cette solution. Les métaux lourds, fer(II) et alcalino-terreux ne gênent pas.

Vert de bromocrésol en solution

Solution dans l'alcool à 95 % vol. contenant 0,04 g de vert de bromocrésol (3',3",5',5"-tétrabromo-*m*-crésolsulfonephtaléine) pour 100 ml de réactif.

Vert de bromocrésol et rouge de méthyle en solution (indicateur mixte)

Dissoudre

Vert de bromocrésol	0,04 g
Rouge de méthyle	0,06 g
dans alcool à 95 % vol.	100 ml

Ajouter 2,5 ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.

Cet indicateur vire du rouge (pH 4,6), au bleu-vert à pH 4,9. Il est violet à pH 4,75.

Zinc en solution à 1 mg par litre

Dissoudre 1 g de zinc pur dans le minimum d'acide chlorhydrique concentré (R) en chauffant légèrement. Diluer la solution à 500 ml et neutraliser par addition de carbonate de sodium jusqu'à apparition d'un léger précipité que l'on fait disparaître par quelques gouttes d'acide chlorhydrique.

Diluer successivement 3 fois 1/10 au moment de l'emploi.

Conformément à la jurisprudence, l'O.I.V. décline toute responsabilité pouvant résulter des erreurs ou des omissions involontaires qui, malgré les soins apportés à la rédaction de l'ouvrage, auraient pu se produire. La reproduction des textes publiés dans cet ouvrage est interdite. Ils sont la propriété de l'O.I.V. qui se réserve le droit de reproduction et de traduction dans le monde entier. La loi interdit les copies ou reproductions destinées à une utilisation collective. Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite par quelque procédé que ce soit sans le consentement de l'O.I.V., est illicite et constitue une contrefaçon.

© OIV – 2026

ISBN : 978-2-85038-135-5

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN
1, RUE MONGE, HÔTEL BOUCHU DIT D'ESTERNO
21000 DIJON
TÉL. (33) 01.44.94.80.80 - TLC. (33) 01.42.66.90.63
E-MAIL: OIV@OIV.INT - WWW.OIV.INT