

C.T.C.P.A.	CONSERVES DE HARICOTS VERTS ET DE HARICOTS BEURRE	DECISION N° 89 Août 2003 Mise à jour : indice c
-------------------	--	--

Titre I - DEFINITION

Article 1

Les conserves alimentaires de "HARICOTS VERTS", de "HARICOTS BEURRE", doivent être conformes aux critères ci-après et préparées à partir de gousses (ou filets), incomplètement mûres, éboutées, de certaines variétés de "*Phaseolus Vulgaris L*" ou de "*Phaseolus multiflorus LMK*".

Article 2

a) Les dénominations "haricots verts", "haricots beurre", suivies du mode de présentation et du calibre s'il y a lieu, sont réservées aux conserves additionnées d'un liquide de couverture composé d'eau, avec addition éventuelle de sel, d'acidifiant, d'antioxygène, et de chlorure de calcium comme affermissant.

b) tout autre mode de préparation du produit est admis à condition

- qu'il soit suffisamment différent des modes de préparation exposés dans la présente décision
- qu'il satisfasse à toutes les autres exigences de la présente décision
- qu'il soit décrit de façon appropriée sur l'étiquette afin qu'il n'y ait pas, pour le consommateur, possibilité de confusion ou d'erreur.

Article 3

Présentation

Les filets doivent être :

- soit de couleur verte (haricots verts)
- soit de couleur jaune (haricots beurre).

Les gousses (ou filets) de haricots peuvent être présentées soit entières, soit coupées.

A) Conserves de haricots entiers :

L'emploi du qualificatif "entier" dans la dénomination n'est pas obligatoire.

B) Conserves de haricots coupés :

a) filets coupés en morceaux de longueur sensiblement uniforme, allant de 2 à 5 cm.

L'emploi du qualificatif "coupés" doit figurer obligatoirement dans la dénomination.

Il est toléré un pourcentage maximum de 20% (rapporté au poids du produit égoutté) de morceaux de longueur inférieure à la longueur minimale.

b) filets coupés en lanières ou en long, de largeur de coupe inférieure à 6,5 mm, résultant d'une coupe oblique ou longitudinale.

L'emploi du qualificatif "coupés en lanières" doit obligatoirement figurer dans la dénomination.

DECISION N° 89 - Conserves de Haricots verts et de haricots beurre - 2/5

c) morceaux de filets d'une longueur aussi uniforme que possible de 10 à 20 mm.

De telles préparations doivent obligatoirement être dénommées, suivant le cas :

- haricots verts petites coupes
- haricots beurre petites coupes

Article 4

Calibrage

a) les filets de haricots verts et beurre, utilisés pour la préparation des produits visés par la présente décision, lorsqu'ils sont calibrés, doivent être calibrés conformément aux indications du tableau ci-après.

b) pour les préparations visées à l'article 3 – B a), le calibrage demeure facultatif. Au cas où il est appliqué, les dénominations à retenir sont celles figurant dans le tableau qui suit, accompagnées alors de la mention "coupés".

c) pour les présentations en lanières (article 3 – B b) et petites coupes (article 3 – B c) aucune mention de calibrage n'est autorisée sur les étiquetages.

DENOMINATION DES HARICOTS	LARGEUR MAXIMALE DU FILET en mm (1)	TOLERANCES EN MASSE (2)
Haricots verts extra-fins Haricots beurre extra fins	6,5 6,5	8% 8%
Haricots verts très fins Haricots beurre très fins	8 8	8% 8%
Haricots verts fins Haricots beurre fins	9 9	8% 8%
Haricots verts mi-fins Haricots beurre mi-fins	10,5 10,5	8%
Haricots verts moyens Haricots beurre moyens Haricots verts Haricots beurre	au-dessus de 10,5 au-dessus de 10,5 non calibrés non calibrés	

(1) Mesurée entre les deux lignes de suture au pied à coulisse

(2) Tolérances de filets hors calibres.

Titre II - SPECIFICATIONS

Article 5

A) Caractéristiques des matières premières.

Les haricots employés à la préparation des produits visés par la présente décision, doivent être frais, sains, entiers, tendres, exempts de taches, et quelle que soit la variété utilisée, non parcheminés.

Ils doivent être soumis à un nettoyage, à un lavage et à un triage appropriés ainsi qu'à un éboutage. Les filets défectueux et les matières étrangères doivent être éliminés.

DECISION N° 89 - Conserves de Haricots verts et de haricots beurre - 3/5

Article 6

B) Caractéristiques générales du produit.

Les quantités nominales nettes et nettes égouttées pour les conserves définies au Titre I de la présente décision et pour les récipients les plus usités doivent correspondre aux indications du tableau ci-après :

	Taux de remplissage	BOITES METALLIQUES	RECIPIENTS EN VERRE
Capacité nominale en ml		212 425 850 2650 3100 4250	212 314 370 580 720 850
Poids net total en g		200 400 800 2495 2920 4000	190 280 330 530 660 780
Poids net égoutté en g			
Haricots entiers	52 %	110 220 440 1375 1610 2210	100 150 180 280 345 430
Haricots en morceaux Art. 3 Ba et Art. 3 Bc	54%	110 225 455 1430 1670 2295	100 155 185 290 360 445
Haricots en lanières Art. 3 Bb	49,5%	105 210 420 1310 1530 2100	95 145 170 265 330 410

Dans le cas de récipient de capacité non prévue dans le tableau ci-dessus, le poids net total est calculé en fonction de la contenance nominale du récipient sur la base de 800 g pour la boîte de 850 ml.

Le poids net égoutté est calculé en fonction de la contenance nominale du récipient sur la base du taux de remplissage indiqué dans le tableau ci-dessus. Les valeurs obtenues sont arrondies à la plus proche valeur inférieure multiple de 5.

Pour les récipients en verre, la capacité nominale est réduite de 20 ml avant calcul.

En ce qui concerne le contrôle des quantités nettes et nettes égouttées, il est fait appel, par les Agents qui en sont chargés, aux méthodes de contrôle statistiques des préemballages définies par la réglementation en vigueur.

Le contrôle métrologique de la quantité nette égouttée est effectué conformément aux modalités prévues pour le contrôle de la quantité nette, seules les erreurs en moins étant doublées.

Titre III - CARACTERES DE QUALITE

Article 7

I - Caractères normaux

Les conserves visées par la présente décision doivent en outre présenter les caractères minimaux ci-après :

- a) Liquide de couverture de teinte claire et limpide ;
- b) Filets tendres mais gardant une bonne tenue ;
- c) Saveur et odeurs franches et normales, absence de toute saveur ou odeur étrangère
- d) Couleur normale caractéristique, sensiblement uniforme
- e) Seules peuvent être étiquetées sous la dénomination "haricots verts extra-fins", des conserves dans lesquelles les filets de longueur supérieure à 60 mm représentent au moins 50% du poids du produit égoutté
- f) Absence de graines nettement formées pour les haricots verts extra-fins.

DECISION N° 89 - Conserves de Haricots verts et de haricots beurre - 4/5

II - Tolérances

A - Définition des défauts :

Haricots filandreux :

Un haricot est reconnu filandreux si un des fils encadrant les filets résiste à la traction.

Filets défectueux :

Sont réputés défectueux les haricots qui comportent des filets rouillés, tachés (tache de diamètre supérieur à 5 mm), piqués, parcheminés (c'est-à-dire dont le parchemin présente un développement sensible à l'examen organoleptique, altérant la valeur de consommation).

Débris végétaux :

Sont considérés comme débris végétaux les parties de la plante (haricot) et matières végétales étrangères inoffensives.

Morceaux de haricots :

Morceaux de haricots dont la longueur est inférieure à 20 mm (pour les conserves de haricots entiers).

Filets non éboutés :

Haricots dont l'attache est encore présente (ne sont pas considérés comme filets non éboutés, les haricots dont reste seule la protubérance où était fixé le pédoncule).

B) sont tolérés les défauts ne dépassant pas, pour chacune des catégories, les proportions suivantes (rapportées au poids du produit égoutté) figurant ci-après :

CATEGORIE	Filets filandreux	Filets non éboutés	Filets défectueux	Morceaux haricots	Débris végétaux	Cumul des défauts
Haricots verts extra-fins	2%	3%	3%	3%	1%	8%
Haricots verts très fins	3%	3%	3%	3%	3%	10%
Haricots verts fins	3%	3%	3%	3%	3%	10%
Haricots beurre très fins et fins	3%	3%	3%	3%	3%	10%
Haricots verts mi-fins	3%	3%	4%	4%	4%	15%
Haricots beurre mi-fins	3%	3%	4%	4%	4%	15%
Haricots verts	3%	3%	5%	5%	5%	20%
Haricots beurre	3%	3%	5%	5%	5%	20%

DECISION N° 89 - Conserves de Haricots verts et de haricots beurre - 5/5

III - Unités défectueuses :

Un préemballage est considéré comme défectueux si l'un des défauts mentionnés dans le tableau ci-dessus est supérieur à une fois et demie la tolérance ou si le cumul des défauts est supérieur à celui indiqué pour chaque catégorie ou si les haricots hors calibre sont supérieurs à une fois et demie la tolérance fixée à l'article 4.

Titre IV - METHODE D'EXAMEN

Article 8

Les prélèvements d'échantillons et l'appréciation des différents caractères visés par la présente décision seront effectués selon les méthodes prescrites par les Autorités chargées de contrôle.

Il est précisé qu'en ce qui concerne l'appréciation des catégories et la détermination du poids du produit égoutté, les méthodes à suivre sont celles indiquées en Annexe.

	DETERMINATION DES QUANTITES NETTES ET NETTES EGOUTTEES DES CONSERVES DE LEGUMES APPERTISES	Fiche : N° 1 Date : Mars 2001 Mise à jour : indice b
---	---	--

① - MODE OPERATOIRE :

La température du produit est ramenée à 20°C ± 5°C. Les mesures sont effectuées à température ambiante du laboratoire.

Peser le récipient avant ouverture (Pb), l'ouvrir*, verser le contenu sur un tamis plat à mailles carrées de 2,5 mm (épaisseur du fil 0,85 mm selon norme ISO 3310/1) préalablement taré. Le diamètre de ce tamis sera de 20 cm pour les récipients de capacité inférieure ou égale à 850 ml et de 30 cm pour les récipients de capacité supérieure à 850 ml.

Incliner le tamis d'environ 20° par rapport à l'horizontale pour faciliter l'égouttage.

Egoutter 2 minutes à partir du moment où le produit est sur le tamis.

Peser le tamis et son contenu (Pe 2).

Rincer le récipient vide et son couvercle, les sécher puis les peser (Pr).

La masse nette = Pb - Pr

La masse nette égouttée = Pe2 - Pe1

Pe1 = la masse du tamis

Toutes les masses sont déterminées avec une précision de 1 g.

*Les boîtes à ouverture facile doivent être ouvertes coté fond opposé à l'ouverture facile afin d'éviter d'abîmer le contenu lors du transvasement .

② - CAS PARTICULIERS :

Mode opératoire applicable aux conserves de flageolets et de légumineuses et aux produits dont le liquide de couverture est pris en empois.

Après avoir versé le contenu du récipient sur le tamis comme indiqué ci-dessus, recouvrir ce dernier d'un autre tamis de même caractéristique ou d'une grille adéquate. Immerger complètement le tamis ainsi recouvert dans une grande quantité d'eau à 20°C ±5, 2 fois 10 secondes. Séparer les deux tamis ou enlever la grille. Incliner le tamis inférieur d'environ 20° par rapport à l'horizontale puis procéder comme en 1.

 <p>centre technique de la conservation des produits agricoles</p>	DETERMINATION PONDERALE DES ELEMENTS DEFECTUEUX	Fiche : N° 2 Date : Mars 1995 Mise à jour : Indice a
---	--	---

- MODE OPERATOIRE :

Après égouttage et détermination de la masse nette égouttée (voir Fiche 1) séparer les éléments défectueux en les classant par catégorie tel que définis dans les différentes décisions. Les peser à 0,1 g près.

Calculer les pourcentages par rapport à la masse nette égouttée mesurée.

	MESURES DIMENSIONNELLES	Fiche : N° 3 Date : Mars 2001 Mise à jour : Indice b
---	--------------------------------	---

- MODE OPERATOIRE :

Les mesures dimensionnelles (longueur, épaisseur, diamètre) sont effectuées à l'aide d'un pied à coulisse au 1/10ème de millimètre.

Les mesures doivent être effectuées de telle façon que le pied à coulisse ne marque pas, ni n'écrase les légumes ou la partie de légume à mesurer.

Le calibre des haricots verts ou beurre doit être mesuré entre les deux lignes de suture.

Le calibre des salsifis doit être mesuré à la partie la plus étroite du morceau ou du tronçon.

	DETERMINATION DU POURCENTAGE DE HARICOTS FILANDREUX	Fiche : N° 5 Date : Mars 1995 Mise à jour : indice a
---	--	---

- MODE OPERATOIRE :

Le pourcentage de haricots filandreux est déterminé sur la masse nette égouttée totale contenue dans le préemballage, pour les récipients de capacité inférieure ou égale à 850 ml.

Pour les récipients de capacité supérieure à 850 ml, l'analyse se fera sur 500 g de haricots égouttés.

Briser par le milieu chaque haricot entre deux doigts.

Ne conserver que les haricots où apparaît un fil dur résistant à la traction, d'une longueur supérieure à 3 cm.

Peser les haricots filandreux à 0,1 g près.

Calculer le pourcentage de haricots filandreux par rapport à la masse nette égouttée mesurée ou par rapport à la masse prélevée (500 g).

	MESURE DE LA DEPRESSION INTERNE DANS LES CONSERVES DE LEGUMES APPERTISES	Fiche : N° 6 Date : Mars 1995 Mise à jour : Indice a
---	---	---

① - PRINCIPE :

La mesure de la dépression interne s'effectue à l'aide d'un vacuomètre muni d'un perforateur.

② - APPAREILLAGE :

- Vacuomètre ou Manomètre à vide métallique de type "Bourdon" mesurant les dépressions par rapport à l'atmosphère gradué en millibars dont l'échelle de lecture permet d'apprécier 25 millibars, muni d'un embout perforateur à ventouse permettant la prise directe de la dépression dans l'emballage.
- Vacuomètre électronique ou tout autre appareil permettant la mesure de la dépression par rapport à l'atmosphère, de précision équivalente muni d'un embout perforateur à ventouse.

③ - MODE OPERATOIRE :

Positionner le perforateur sur une partie plane de l'emballage (fond des boîtes, couvercle de bocal), pour avoir le meilleur contact avec la ventouse. Appuyer fermement sans à coup le perforateur pour que la pointe fixée dans la ventouse perce l'emballage. Lire aussitôt la valeur affichée sur le vacuomètre en maintenant un appui ferme.

Après chaque mesure, la pointe doit être essuyée pour éviter toute obstruction de la tubulure reliée ou soudée au vacuomètre.

	DETERMINATION DE LA TENEUR EN MATIERES GRASSES	Fiche : N° 7 Date : Mars 1995 Mise à jour : Indice a
---	---	--

1 - PRINCIPE :

Extraction de l'échantillon séché par du n hexane ou de l'éther de pétrole. Elimination du solvant par évaporation, séchage du résidu sec puis pesée après refroidissement.

2 - APPAREILLAGE :

- broyeur homogénéiseur à hélice
- appareil d'extraction continu de type Soxhlet ou similaire
- cartouche d'extraction
- étuve à 104°C ± 3°C
- dessiccateur garni d'un déshydratant efficace
- balance analytique

3 - REACTIF :

- n hexane ou éther de pétrole 40-65
- sulfate de sodium anhydre

4 - MODE OPERATOIRE :

Sécher pendant une heure à l'étuve réglée à 104°C ± 3°C la fiole de l'appareil d'extraction. Laisser refroidir la fiole jusqu'à la température ambiante dans le dessiccateur et peser à 1 mg près (soit Mo cette masse).

Broyer et homogénéiser la totalité du produit (légumes + liquide de couverture ou sauce) contenu dans le préemballage afin d'obtenir une pâte lisse. Dans un bécher de 100 ml peser exactement 10 g environ, à 1 mg près, du produit homogénéisé. Ajouter en mélangeant à l'aide d'un agitateur, du sulfate de sodium anhydre jusqu'à obtention d'une masse sèche se détachant facilement des parois du bécher. Transvaser cette

masse sèche de façon quantitative dans la cartouche d'extraction. Mettre la cartouche dans l'appareil d'extraction.

Verser dans la fiole de l'appareil d'extraction un volume de solvant d'extraction égal à 1,5 à 2 fois la capacité du tube intérieur de l'appareil.

Ajuster le ballon à l'appareil d'extraction.

Chauffer la fiole au bain-marie ou sur un appareil similaire approprié pendant quelques heures selon la vitesse d'extraction et l'appareil utilisé (4 heures en général).

Après extraction le solvant est éliminé totalement. Evaporer les dernières traces au bain marie.

Sécher la fiole pendant une heure à $104^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et après refroidissement à la température ambiante dans le dessiccateur.

Peser à 1 mg près (soit M_1 cette masse).

Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon préparé.

EXPRESSION DES RESULTATS :

La teneur en matières grasses en pour cent en masse de l'échantillon est égale à

$$(M_1 - M_0) \times \frac{100}{E}$$

M_0 masse en grammes de la fiole

M_1 Masse en grammes de la fiole et de la matière grasse après séchage

E Masse en grammes de la prise d'essai

Exprimer le résultat avec une seule décimale.

Répétabilité :

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre ne doit pas être supérieure à 0,5 g de matière grasse pour 100 g d'échantillon.

	DETERMINATION DE LA TENEUR EN IMPURETES MINERALES SABLES - GRAVIERS	Fiche : N° 8 Date : Mars 1995 Mise à jour : indice a
---	--	---

① - PREPARATION DE L'ECHANTILLON :

Homogénéiser l'ensemble des légumes égouttés après la détermination de la masse nette égouttée pour les préemballages de volume inférieur ou égal à 850 ml.

Pour les préemballages de volume supérieur, prélever 500 g de la masse nette égouttée et l'homogénéiser.

CAS PARTICULIER DES EPINARDS HACHES OU EN PUREE :

Pour les préemballages de volume inférieur ou égal à 850 ml, homogénéiser entièrement leur contenu. Pour les préemballages de volume supérieur, mélanger soigneusement avec un agitateur tout le contenu. Peser 500 g de produit et les homogénéiser dans un homogénéisateur à hélice.

② - MODE OPERATOIRE :

Peser exactement à 0,5 g près la totalité du produit homogénéisé en ①, puis suivre le mode opératoire de la norme NFV05103 13/07/62 Détermination de la teneur en impuretés minérales d'origine terreuse.

	DOSAGE DES SUCRES PAR VOIE ENZYMATIQUE DU SACCHAROSE ET DU GLUCOSE	Fiche : N° 9 Date : Mars 1995 Mise à jour : indice a
---	---	--

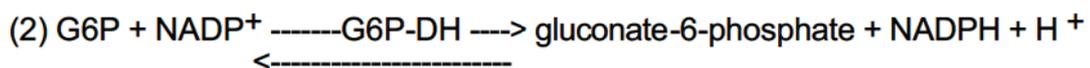
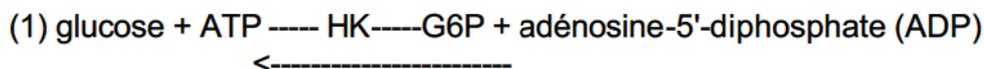
1 - PRINCIPE :

On dose le glucose avant et après l'hydrolyse enzymatique du saccharose.

- Dosage du glucose avant inversion :

L'hexokinase (HK) catalyse la phosphorylation du glucose par l'adénosine 5' triphosphate (ATP) à pH 7,6.

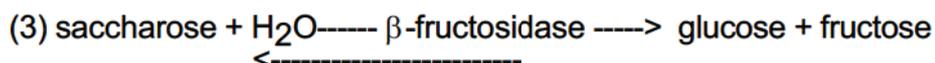
Dans une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6P-DH) le glucose-6-phosphate formé (G6P) est oxydé spécifiquement en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) en gluconate-6-phosphate, avec formation de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (NADPH).



La formation de NADPH, mesurée par l'augmentation de l'extinction à la longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm est proportionnelle à la quantité de glucose présente.

- Inversion enzymatique :

Le saccharose est hydrolysé à pH 4,6 par la β -fructosidase (invertase) en glucose et fructose.



Le dosage du glucose après inversion (glucose total) se fait parallèlement selon le procédé décrit plus haut. La différence entre les teneurs en glucose avant et après inversion permet de calculer la teneur en saccharose.

② - REACTIFS :

Tous les réactifs utilisés doivent être de pureté analytique reconnue, l'eau utilisée doit être bidistillée.

- Solution tampon citrate pH 4,6 :

- . acide citrique 1 H₂O 6,9 g
- . citrate trisodique 2 H₂O 9,1 g
- ajouter environ 150 ml d'eau distillée, mélanger
- . ajouter une solution de soude à 0,2 mole/litre jusqu'à pH 4,6.
- . eau distillée QS 200 ml

La solution est stable un an à +4°C.

- Solution de β-fructosidase :

- . β-fructosidase 10 mg
- . eau bidistillée 2 ml

La solution est stable une semaine à +4°C.

- Solution tampon triéthanolamine pH 7,6 :

- . chlorhydrate de triéthanolamine 14,0 g
- . sulfate de magnésium (SO₄ Mg 7H₂O) 0,25 g
- ajouter environ 80 ml d'eau bidistillée, mélanger,
- . solution de soude à 5 moles/litre environ 5 ml
- (le pH doit être ajusté à 7,6 avec la soude)
- . eau bidistillée Q S 100 ml

Cette solution est stable 4 semaines à +4°C.

- Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) :

. NADP Na ₂ H	60 mg
. eau bidistillée	6 ml

Cette solution est stable 4 semaines à +4°C

- Solution d'adénosine 5' -triphosphate (ATP) :

. ATP Na ₂ H ₂	300 mg
. carbonate acide de sodium (NaHCO ₃)	300 mg
. eau bidistillée	6 ml

Cette solution est stable 4 semaines à +4°C.

- Solution d'hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase (HK/G6P - DH) :

Utiliser la suspension (2 mg de HK/ml, 1 mg de G6P-DH/ml) sans dilution.

Cette suspension est stable un an à + 4°C.

- solution étalon de glucose : contenant 1 g/l de glucose

- solution étalon de saccharose : contenant 1 g/l de saccharose

③ - APPAREILLAGE :

Matériel courant de laboratoire et notamment

- homogénéiseur de laboratoire.

3.1 - **Pipettes et micro-pipettes** permettant de délivrer 0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 1 ; 1,7 ; 1,8 ; 1,9 ml et 10 ml **NF B 35-305**

3.2 - **Spectrophotomètre** permettant des mesures à 340 nm et muni de cuves de 1 cm de trajet optique. Il est possible d'utiliser des cuves à usage unique.

Photocolorimètre à filtre permettant une mesure à 334 ou 365 nm.

3.3 - Balance analytique.

④ - MODE OPERATOIRE

4.1 - Préparation de l'échantillon

- échantillons liquides

Utiliser pour l'essai des solutions claires incolores ou légèrement colorées directement ou après dilution si nécessaire. Filtrer les solutions troubles ou clarifier les avec les réactifs de Carrez.

- échantillons solides

Broyer les échantillons solides ou pâteux (fruits, légumes, confitures...) avec un mixer, un hachoir. Peser l'échantillon bien homogénéisé, extraire à l'eau (chauffer à 60°C si nécessaire). Transférer quantitativement dans une fiole jaugée, ajuster. Filtrer. Utiliser la solution limpide éventuellement diluée comme essai.

4.2 - Essai étalon

Pour chacune des déterminations, effectuer un essai étalon dans les mêmes conditions que les essais respectifs (4.4 et 4.5) mais en remplaçant la prise d'essai par 0,1 ml de solution étalon de saccharose (3.8) ou de glucose (3.9) ou de fructose (3.10).

4.3 - Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions que la détermination du saccharose mais en remplaçant la prise d'essai par de l'eau.

4.4 - Détermination du glucose et du saccharose

Les réactions enzymatiques se font directement dans les cuves de lecture du spectrophotomètre.

- mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, à une température constante entre 20 à 25°C, en ajustant le zéro soit sur l'air (pas de cuve sur le trajet optique), soit sur une cuve remplie d'eau distillée.

- introduire dans des cuves :

	Témoin	Dosage direct	Dosage après hydrol.
. solution tampon citrate	0,20 ml	rien	0,20 ml
. solution à doser ou solution étalon	rien	0,10 ml	0,10 ml
. solution de β -fructosidase	0,02 ml	rien	0,02 ml

mélanger, conserver les cuves à une température de 20 à 25°C pendant 15 minutes, ajouter :

. solution tampon triéthanolamine	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
. eau bidistillée	1,70 ml	1,82 ml	1,60 ml
. solution de NADP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
. solution d'ATP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml

Mélanger, lire la densité optique des solutions (E_1) au bout de 3 minutes environ. Démarrer la réaction enzymatique par addition de :

. solution de HK/G6P-DH	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
-------------------------	---------	---------	---------

Mélanger, attendre la fin de la réaction (environ 10 à 15 minutes) et mesurer la densité optique des solutions (E_2). Si la réaction n'est pas terminée au bout de 15 minutes, continuer à lire les densités optiques de 5 minutes en 5 minutes jusqu'à ce que l'augmentation soit constante.

Si l'on observe des augmentations d'extinctions constantes, extrapoler au temps d'addition de la HK/G6P-DH.

Calculer les différences d'extinction ($E_2 - E_1$) du témoin et du dosage.

Déduire la différence d'extinction du témoin de celle du dosage

$$\Delta E = \Delta E_d - \Delta E_t = (E_2 - E_1)_{\text{dosage}} - (E_2 - E_1)_{\text{témoin}}$$

et ce, avant et après hydrolyse.

5 - EXPRESSION DES RESULTATS

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante :

$$C \text{ en g/L} = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$$

dans laquelle :

V est le volume total dans la cuve, 3,14 ml

v est le volume de la prise d'essai

PM est le poids moléculaire de la substance à doser

d est l'épaisseur de la cuve en cm (1 cm)

ε est le coefficient d'extinction du NADPH, 6,3 pour 340 nm, 3,5 pour 365 nm, 6,18 pour 334 nm.

On obtient ainsi pour le glucose :

$$\begin{aligned} C \text{ en g/L} &= \frac{3,14 \times 180,16}{\varepsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta E \text{ glucose avant hydrolyse} \\ &= 5,657 \times \frac{\Delta E}{\varepsilon} \end{aligned}$$

et pour le saccharose :

$$\begin{aligned} C \text{ en g/L} &= \frac{3,14 \times 342,3}{\varepsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times (\Delta E \text{ glucose total} - \Delta E \text{ glucose avant hydrolyse}) \\ &= 10,75 \times \frac{\Delta E \text{ glu. tot.} - \Delta E \text{ glu. av. hyd.}}{\varepsilon} \end{aligned}$$

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution F.

La quantité de saccharose et de glucose dans la cuve doit être comprise entre 5 et 150 μg (mesure à 365 nm) ou 5 à 80 μg (mesure à 340 ou 334 nm). Diluer la solution à doser de manière à ce que la concentration en sucre soit comprise entre 0,05 et 1,5 g/l ou entre 0,05 et 0,8 g/l.

	DOSAGE DES SUCRES METHODE PAR HPLC	Fiche : N° 10 Date : Mars 1995 Mise à jour : Indice a
---	---	--

1 - PRINCIPE :

Détermination des mono et disaccharides dans les liquides de couverture de certains légumes par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et détection réfractométrique. L'identification des sucres repose sur le temps de rétention et l'analyse quantitative sur un étalonnage externe utilisant la surface ou la hauteur des pics.

2 - REACTIFS :

Pendant l'analyse, sauf spécifications contraires, n'utiliser que des réactifs de teneur analytique connue et de l'eau ayant une classe de pureté de minimum 3, conformément à la norme ISO 3696.

2.1 - Acetonitrile pour analyse HPLC

2.2 - Solutions étalons de sucres

2.2.1 - Solution étalon de glucose et de fructose

Peser au milligramme près dans le même becher environ 500 mg de fructose et 500 mg de glucose. Les dissoudre dans de l'eau. Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster le volume à 100 ml. La solution se conserve 10 jours au maximum à + 4°C environ.

2.2.2 - Solution étalon de saccharose

Peser au milligramme près dans un becher environ 500 mg de saccharose. Le dissoudre dans de l'eau. Transvaser dans une fiole de 100 ml, ajuster le volume à 100 ml. La solution se conserve 10 j au maximum à + 4°C environ.

③ - APPAREILLAGE :

Appareillage courant de laboratoire et en particulier :

3.1 - Système de filtration permettant de filtrer le jus ou le liquide de couverture avec un filtre de 0,45 μm de porosité. Par exemple il pourra être utilisé un système de filtre à monter sur seringue.

3.2 - Filtre à membrane compatible avec la solution d'élution de pore $\leq 0,45 \mu\text{m}$

3.3 - Ensemble de chromatographie liquide, comprenant une pompe, un injecteur d'échantillon, un détecteur réfractométrique.

3.4 - Colonne de séparation : colonne de silice greffée NH_2

④ - MODE OPERATOIRE :

4.1 - Préparation de l'échantillon :

Peser à 1 mg près 10 g environ de jus ou de liquide de couverture. Transvaser cette prise d'échantillon dans une fiole jaugée de 100 ml. Diluer et compléter à 100 ml avec de l'eau.

Filtrer la solution obtenue sur le filtre 3.2.

4.2 - Dosage :

Injecter la solution filtrée (4.1) dans le système chromatographique.

Conditions chromatographiques :

- Phase mobile : Acétonitrile/eau (80/20 V/V)
- Débit 1,2 ml/min.
- Température de la colonne : environ 30°C
- Détecteur réfractomètre
- Colonne (3.4)

Le dosage est effectué par la méthode d'étalonnage externe.

Intégrer les surfaces des pics ou déterminer leur hauteur et déterminer les concentrations en sucre par rapport aux étalons.

Une autre méthode consiste à faire une courbe d'étalonnage.

5 - MODE DE CALCUL :

Calculer en grammes pour 100 g d'échantillon, la concentration en fructose, glucose, saccharose à partir de l'équation suivante :

$$p \% = \frac{A_1 V_1 m_1}{A_2 V_2 m_0} \times 100$$

ou A_1 est la surface ou la hauteur du pic pour le fructose, le glucose ou le saccharose de la solution pour essai (4.1) exprimée en unité de surface ou de longueur.

A_2 est la surface ou la hauteur du pic pour le fructose, le glucose ou le saccharose de la solution étalon (2.2) exprimée en unité de surface ou de longueur.

V_1 est le volume total exprimé en millilitre de la solution (4,1) pour essai.

V_2 est le volume total exprimé en millilitre de la solution étalon 2.2.

m_1 est la masse exprimée en grammes respectivement de fructose, de glucose et de saccharose contenues dans V_2 .

m_0 est la masse initiale de l'échantillon exprimée en gramme