

AUTOMATISATION EN FLUX CONTINU DU DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE MALIQUE DES VINS

Aline LONVAUD-FUNEL *, B. DONECHE * et D. BLEUZE **

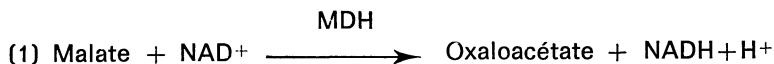
* Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

** BOEHRINGER MANNHEIM FRANCE S.A.
2, avenue du Vercors, 38240 Meylan

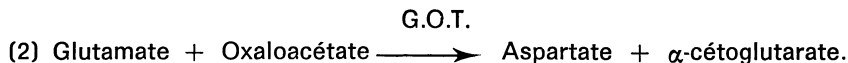
La méthode enzymatique de dosage du malate dans les vins est la seule méthode spécifique. Mais, en raison des manipulations qu'elle comporte, elle est peu adaptée à l'analyse de grandes séries d'échantillons. L'automatisation devrait permettre d'atteindre des cadences rapides de dosage et de supprimer l'aspect fastidieux du dosage tout en conservant ses qualités.

PRINCIPE DU DOSAGE ET DISCUSSION

La méthode enzymatique que nous automatisons fait intervenir la malate deshydrogénase et la glutamate-oxaloacétate-transaminase (MOLLERLING, 1974). Le malate est oxydé par la MDH en présence de NAD⁺ (réaction 1).



On mesure à 340 nm l'augmentation de densité optique provoquée par la formation du NADH. Mais l'équilibre de cette réaction n'est pas favorable à l'oxydation du malate. Pour le déplacer on utilise la réaction (2) qui élimine l'oxaloacétate par transamination avec le glutamate.



En dosages manuels cette méthode donne de bons résultats ; l'oxydation de la totalité du malate est plus rapide qu'avec la méthode utilisant l'hydrazine (GUTMAN et WAHLEFELD, 1974) pour déplacer la réaction (1).

Mais à 340 nm les vins rouges ou blancs présentent une absorption importante comme le montrent les tracés des spectres réalisés pour des vins dilués dans un tampon à pH 10,0 (fig. 1). Cette caractéristique n'est

pas un inconvénient pour le dosage manuel puisqu'on note l'augmentation de densité optique provoquée après l'addition de l'enzyme. Par contre, cela constitue l'obstacle principal à l'automatisation du dosage, *BATLLE et al., 1978*, proposent le passage d'un blanc, sans addition d'enzyme, après le passage du mélange complet échantillon et réactif. La densité optique

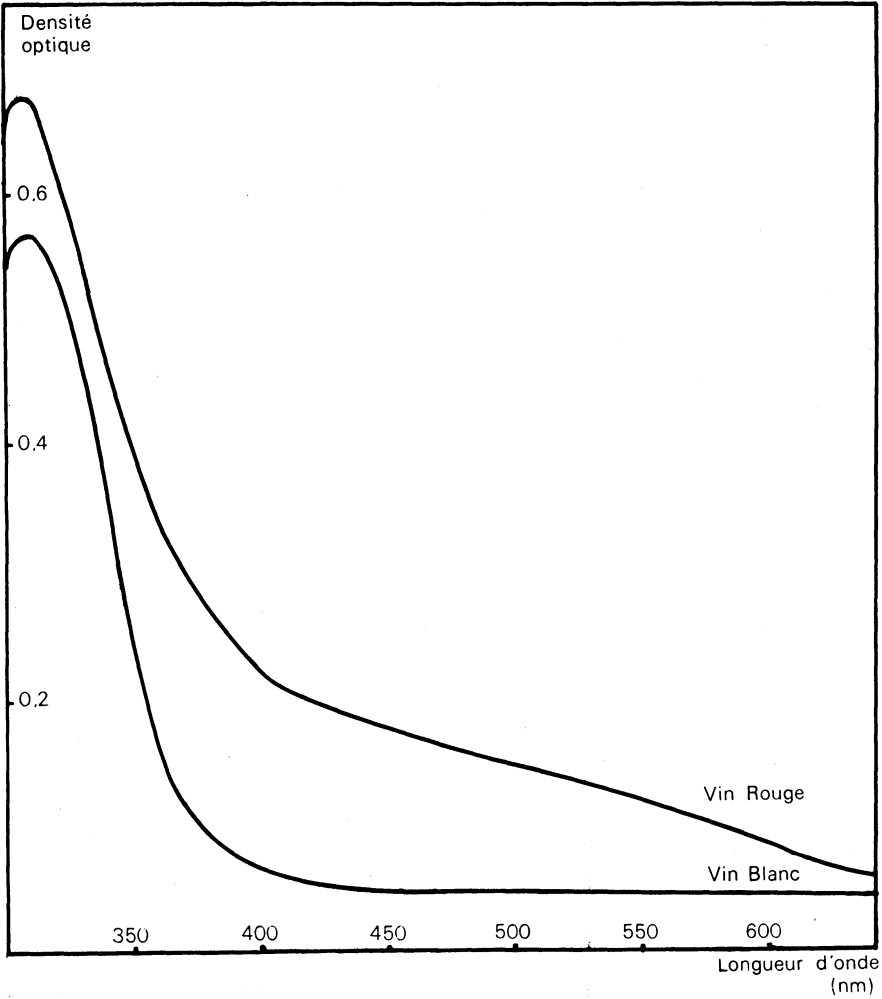


Fig. 1. — Spectres d'absorption d'un vin rouge et d'un vin blanc à pH 10,0.

du blanc est retranchée de celle du dosage proprement dit, pour chaque échantillon. Si cette méthode donne de bons résultats, elle n'est pas absolument satisfaisante puisqu'elle exige deux passages de l'ensemble des échantillons. C'est pourquoi nous avons envisagé d'autres solutions à ce problème.

La décoloration du vin par le charbon ou le P.V.P. ne donne pas de bons résultats. Elle provoque une perte d'acide malique par adsorption variable selon l'échantillon et le mode de décoloration. En utilisant le minimum de charbon nécessaire pour la décoloration des vins, nous avons obtenu les résultats suivants. Tableau I.

TABLEAU I
Influence de la décoloration par le charbon
sur le dosage enzymatique de l'acide malique
 Les chiffres sont des g/l

	Flux continu		Manuel
	Direct	Vin déféqué	
Vins blancs	2,22	2,00	2,08
	2,24	2,12	2,14
	1,63	1,51	1,52
	2,46	2,34	2,29
Vins rouges	1,52	1,31	1,11
	0,42	0,17	0,16

La concordance assez satisfaisante entre les résultats obtenus en flux continu après décoloration et en méthode manuelle n'est cependant pas systématique. En outre, la décoloration préalable du vin n'est pas adaptée à l'analyse en flux continu.

La dialyse est une autre solution pour l'élimination des interférences du vin. Cependant, elle s'est avérée inefficace car les molécules responsables de l'absorption à 340 nm (tanins, anthocyanes, chalcones, flavanols) dialysent facilement. L'amélioration apportée par la dialyse dans nos essais tient probablement à la dilution qu'elle entraîne (tableau II).

Outre les deux méthodes précédentes, décoloration et dialyse, on peut envisager la lecture de l'absorption à 340 nm par rapport à une référence pour tenir compte de l'absorption du vin. Il faut pour cela disposer d'un colorimètre à deux canaux ; dans l'une des cuves circule le flux de référence constitué par le tampon, le NAD⁺ et le vin et dans l'autre le flux de dosage additionné des enzymes. Dans ces conditions, la différence d'absorption enregistrée correspond uniquement à la production de NADH. La cassette analytique comporte alors deux circuits parfaitement identiques. L'échantillon dilué dans le tampon est divisé et distribué dans les deux circuits. Dans l'un d'eux, il reçoit l'addition d'enzyme remplacée dans l'autre par la même quantité de tampon. Théoriquement, cette méthode devrait être satisfaisante. Cependant, avec l'appareillage dont nous

disposons (Auto Analyseur AAll Technicon) il ne nous a pas été possible d'obtenir un phasage rigoureux des deux flux. D'autre part, cette méthode exige un investissement plus important puisqu'il faut réaliser en double un circuit comprenant un dialyseur, un bain-marie et diverses bobines de mélange.

Une autre solution au problème consiste à modifier la méthode de façon à effectuer les mesures dans une zone de longueurs d'onde où le vin présente l'absorption minimale.

TABLEAU II
Influence de la dialyse sur le dosage enzymatique
de l'acide malique

Les chiffres sont des g/l

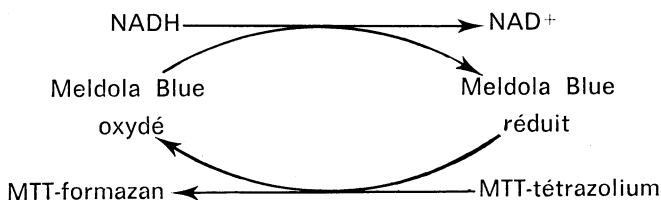
	Flux continu		Manuel
	Non dialysé	Dialyse 6" Type C	
Vin blanc	1,922	1,858	1,365
Vins rouges	0,650	0,340	0,098
	0,713	0,415	0,121
	1,594	1,345	1,115
	0,618	0,298	0,158

DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE ADAPTEE

1°) Principe :

La première partie des réactions est identique aux équations (1) et (2). Elle est ensuite couplée avec une réaction d'oxydoréduction utilisant des colorants.

Le NADH réduit un sel de tétrazolium en son sel de formazan qui absorbe dans le visible. Nous avons choisi comme sel de tétrazolium le MTT [3-(4,5 diméthyl thiazolyl-2)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] dont le sel de formazan présente un maximum d'absorption à 578 nm. Le transfert de l'hydrogène du NADH au MTT se fait grâce au Meldola Blue (8-diméthylamino-2,3-benzo phenoxazin).



Le mode opératoire est alors le suivant : l'échantillon dilué dans le tampon est dialysé puis additionné des enzymes. Après passage dans un bain-marie à 37 °C, le flux reçoit le mélange des colorants MTT et Meldola Blue. Après réaction pendant environ 8 minutes le flux arrive au colorimètre où l'on enregistre la densité optique à 570 nm.

2°) Composition des réactifs :

— préparation du mélange réactionnel : le contenu des flacons du « coffret Malate » Boehringer Mannheim sont mélangés et portés à un volume total de 80 ml.

Flacon 1 : tampon glycyglycine pH 10,0
acide L-glutamique : 410 mg
stabilisateurs

Flacon 2 : β -NAD lyophilisé 210 mg

Flacon 3 : glutamate-oxaloacétate-transaminase 160 U

Flacon 4 : L-MDH 2400 U

Ce mélange réactionnel conservé à + 4 °C est stable 4 jours.

— Préparation du tampon glycyglycine 0,02 M : 2,64 g de glycyglycine dissous dans l'eau, ajusté à pH 10,0 avec de la soude 5N et complété à 1 litre. Addition de 1 ml de Brij 35.

— Préparation du colorant :

. MTT : [3-(4,5 dimethyl thiazolyl-2)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] 188 mg.

. Meldola Blue [8-diméthylamino-2,3-benzophénoxazin] 25 mg.

. HCl 12 N 10 ml

. Triton X 100 25 ml

. Eau distillée q.s.p. 1000 ml

Le colorant ainsi préparé se conserve plus d'une semaine à 4 °C.

3°) Diagramme des flux :

La figure 2 représente le schéma du montage utilisé.

RESULTATS OBTENUS

1°) Courbes d'étalonnage :

Nous avons calculé les équations des droites d'étalonnage correspondant aux gammes 0 à 5 g/l, 0 à 0,5 g/l et 0 à 1 g/l. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux III et IV.

En ce qui concerne la gamme de 0 à 5 g/l les résultats sont satisfaisants pour tous les rapports de flux présentés dans le tableau III, et l'optimum correspond au rapport 0,06/1,0. Pour les autres gammes l'utili-

sation du flux 0,6 ml/mn pour l'échantillon avec 0,8 pour le tampon est la meilleure solution. En conséquence, pour plus de commodité on peut monter un circuit dont le flux de tampon est 0,8 ml/mn. Il suffit alors pour changer de gamme de modifier le flux de prise d'échantillon.

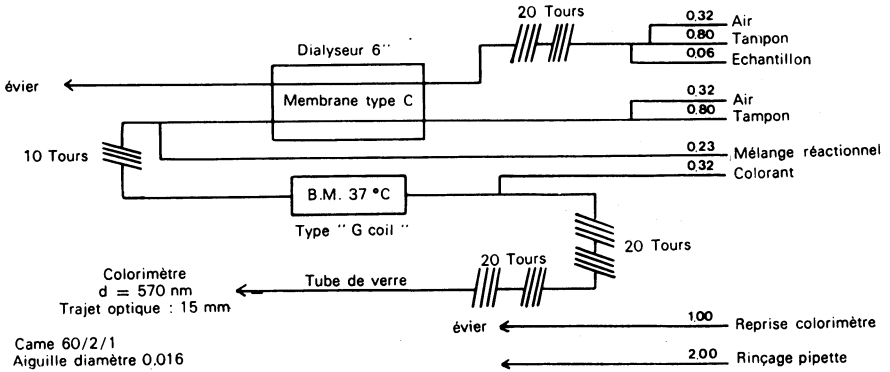


Fig. 2. — Diagramme des flux.

Pour le dosage de fortes concentrations en acide malique, supérieures à 5 g/l et jusqu'à 10 g/l, cette méthode peut être adaptée en augmentant la dilution de l'échantillon ou diminuant simplement la calibration.

TABLEAU III

Droites d'étalonnage de 0 à 5 g/l d'acide malique

y : hauteur du pic en mm

x = g/l d'acide malique

Flux échantillon Flux tampon	Equation de la droite $y = ax + b$	Coefficient de corrélation
0,06/0,8	$43,6x + 6,4$	0,9995
0,06/0,8	$47,4x + 4,8$	0,9999
0,06/1,0	$43,6x - 1,2$	0,9998
0,06/1,2	$37,8x + 0,4$	0,9995

2°) Répétabilité :

Dans le tableau V, nous donnons les résultats pour n répétitions de 8 échantillons différents.

L'erreur sur la moyenne a été calculée au seuil de confiance de 99 p. 100. Dans le cas le plus défavorable l'erreur relative est de l'ordre de 2 p. 100.

3°) Comparaison avec d'autres méthodes.

Le tableau VI permet la comparaison entre la méthode étudiée et d'autres méthodes de dosage. Les 6 vins ont été analysés par la méthode enzymatique utilisant l'hydrazine, celle mettant en jeu la transamination du glutamate et la chromatographie en phase gazeuse. On constate que

TABLEAU IV

Droite d'étalonnage de 0 à 0,5 g/l et 0 à 1 g/l
Rapport des flux échantillon/tampon = 0,6/0,8

Gamme	Equation de la droite	Coefficient de corrélation
0 à 0,5	$345,7x - 1,5$	0,9998
»	$464,0x$	1,0000
»	$458,8x - 0,5$	0,9998
0 à 1	$231,4x$	0,9998

les méthodes enzymatiques manuelles donnent systématiquement des concentrations plus faibles ; c'est surtout le cas de la méthode à l'hydrazine pour laquelle les écarts atteignent 36 p. 100 pour un échantillon, par rapport à la chromatographie en phase gazeuse ou à la méthode automatisée. L'autre méthode enzymatique donne de meilleurs résultats.

TABLEAU V

Répétabilité de la méthode

n	Moyenne	Ecart type	Erreur sur la moyenne (99 p. 100)
5	0,272	0,003	0,006
5	0,218	0,001	0,003
8	0,150	0,001	0,001
9	0,162	0,001	0,001
9	0,677	0,012	0,013
10	1,200	0,014	0,014
9	1,687	0,015	0,017
10	2,185	0,017	0,017

Par contre, on remarque la bonne concordance entre la chromatographie en phase gazeuse et la méthode automatisée. C'est pourquoi d'autres échantillons ont été analysés par ces deux méthodes afin de les comparer plus précisément.

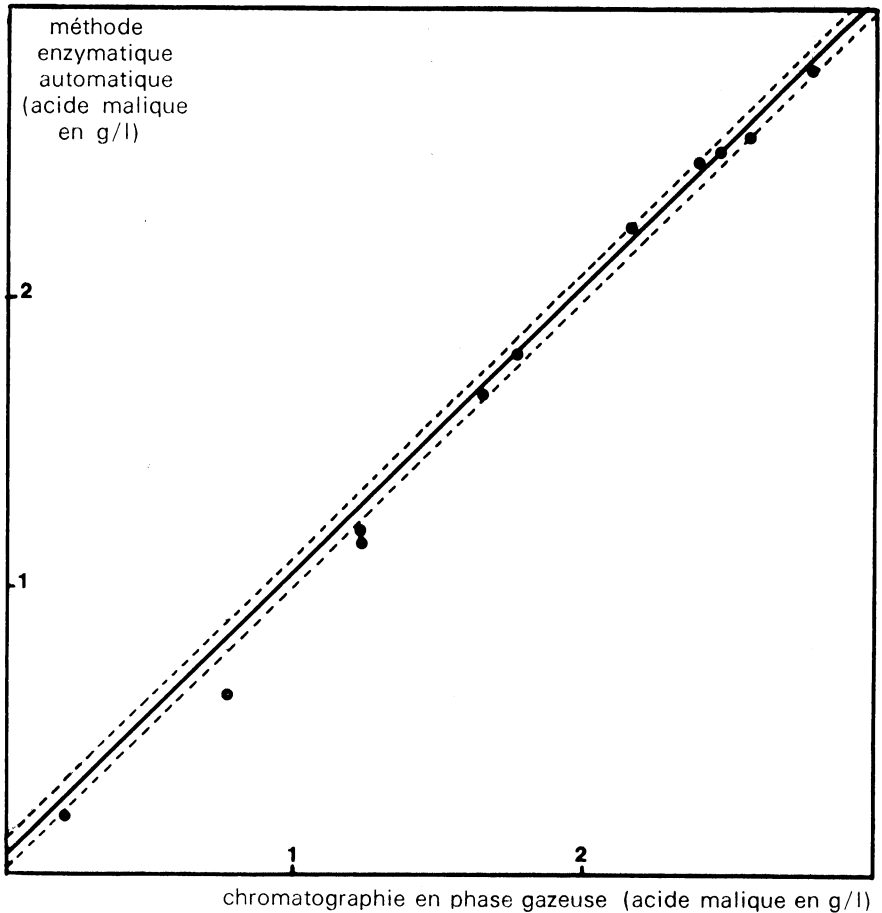


Fig. 3. — Corrélation entre les résultats de la méthode automatisée et ceux de la chromatographie en phase gazeuse.

4°) Corrélation avec la chromatographie en phase gazeuse :

On a comparé les résultats de dosages de 11 vins obtenus par la méthode enzymatique automatisée et par la chromatographie en phase gazeuse (BERTRAND, 1974). Les résultats présentés sur la figure 3 et le tableau VII montrent qu'il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes.

TABLEAU VI**Comparaison avec d'autres méthodes de dosage de l'acide malique**

Les résultats sont exprimés en g/l

Vin N°	Méthode enzymatique			Chromatographie en phase gazeuse
	manuelle (1)	manuelle (2)	automatisée	
1	1,89	2,08	2,50	2,46
2	1,81	2,14	2,46	2,39
3	0,77	1,12	1,18	1,21
4	0,10	0,16	0,20	0,19
5	1,22	1,52	1,79	1,76
6	1,99	2,29	2,56	2,56

(1) Utilisation de l'hydrazine.

(2) Avec transamination du glutamate.

TABLEAU VII**Comparaison entre la méthode enzymatique automatisée et la chromatographie en phase gazeuse**

N°	Chromatographie phase gazeuse (x)	Enzymatique automatisée (y)
1	0,76	0,61
2	1,22	1,14
3	1,64	1,66
4	2,15	2,24
5	2,78	2,78
6	2,46	2,50
7	2,39	2,46
8	1,21	1,18
9	0,19	0,20
10	1,76	1,79
11	2,56	2,56

Droite de régression $y = 1,044x - 0,076$
 Coefficient de corrélation $r = 0,998$
 Ecart type lié $S_{yx} = 0,054$

CONCLUSION

L'intérêt du dosage enzymatique de l'acide malique est maintenant largement reconnu. Des vins ne présentant pas de tache en chromatographie sur papier peuvent contenir en réalité plusieurs dizaines de milligrammes d'acide malique par litre. L'automatisation en flux continu permet

de conserver la sensibilité et la spécificité du dosage enzymatique et d'obtenir les résultats d'analyse rapidement. Les performances de la méthode telle que nous la décrivons sont satisfaisantes. La répétabilité est bonne et la corrélation très étroite avec la chromatographie en phase gazeuse.

Manuscrit reçu le 15 décembre 1980.

RÉSUMÉ

Les auteurs présentent une méthode de dosage enzymatique automatisée en flux continu de l'acide malique dans les vins. Afin d'éviter les interférences la formation de NADH est mesurée à 570 nm ; la méthode décrite conserve les caractères de spécificité et de sensibilité de la méthode enzymatique manuelle.

SUMMARY

The authors report a continuous flow technic for enzymatic analysis of malic acid in wines. In order to minimize the effect of interfering compounds, the NADH content is read at 570 nm. This method preserve the specificity and sensibility of the enzymatic manual assay.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Autoren beschreiben eine enzymatische Bestimmung der Apfelsäure im Wein mit Hilfe des Durchflussverfahrens. Um Interferenzen zu vermeiden, wird die Bildung von NADH bei 570 nm gemessen ; die Methode behält die spezifischen Eigenschaften sowie die Sensibilität der manuellen enzymatischen Analyse bei.

RESUMEN

Los autores presentan un método para la determinación enzimática del ácido málico de los vinos. Se trata de un procedimiento automatizado de flujo continuo, en el que la formación de NADH se mide a 570 nm con objeto de evitar posibles interferencias. El método descrito posee las mismas características de especificidad y sensibilidad que el método enzimático manual.

RIASSUNTO

Gli autori presentano un metodo di dosaggio enzimatico automatizzato con un flusso continuo d'ell'acido malico nei vini. Per evitare le interferenze, la formazione di NADH è misurata a 570 nm ; il metodo descritto mantiene i caratteri di specificità e di sensibilità del metodo enzimatico manuale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BATLLE J.L., JOUBERT R., COLLON Y. et JOURET C., 1978. Dosage enzymatique en flux continu du L-malate et du L-lactate dans les moûts de raisin et les vins. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **71**, N° 766, 223-228.

- BERTRAND A., 1974. Dosage des principaux acides du vin par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **77**, 717-718, 253-274.
- GUTMANN I. et WAHLEFELD A.W., 1974. In *Methods of enzymatic analysis*, p. 1585-80. H.U. Bergmeyer. Academic Press. Inc., New-York.
- MOLLERING H., 1974. In *Methods of enzymatic analysis*, p. 1589-93. H.U. Bergmeyer Academic Press. Inc., New-York.

