Connaissance Vigne Vin, 1985, **19,** n° 3, 161-169.

AUTOMATISATION EN FLUX CONTINU DU DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE ACETIQUE DANS LES VINS

B. DONECHE et P. J. SANCHEZ

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

L'analyse automatique en flux continu est actuellement très utilisée en œnologie. De nombreux laboratoires pratiquent la détermination simultanée de 2 ou 4 paramètres. En fonction des nécessités de la pratique œnologique, ces paramètres sont choisis parmi les analyses suivantes : acidité totale ; acidité volatile corrigée ; anhydride sulfureux libre ; anhydride sulfureux total ; sucres réducteurs.

Si la majorité de ces déterminations sont réalisées à une cadence analytique de 50 à 60 échantillons par heure, la mesure de l'acidité volatile corrigée par entraînement à l'azote exige de travailler à une cadence plus faible (30 échantillons par heure). L'automatisation du dosage enzymatique de l'acide acétique devrait permettre une meilleure utilisation des chaînes d'analyses à paramètres multiples, avec une cadence de travail d'au moins 45 échantillons par heure.

PRINCIPE DU DOSAGE

La méthode enzymatique que nous automatisons fait intervenir l'acétylcoA synthétase (ACS), la citrate synthase (CS) et la malate déshydrogénase (MDH) (BERGMEYER et MOLLERING, 1974).

L'acide acétique (acétate) est converti par l'acétylcoA synthétase en acétylcoA, en présence d'ATP et de coenzyme A :

$$\text{(1) Acétate} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightarrow{\text{ACS}} \text{AcétylcoA} + \text{AMP} + \text{pyrophosphate}$$

L'acétylcoA réagit avec l'oxaloacétate pour donner du citrate en présence de citrate synthase :

$$\text{(2) AcétylcoA} + \text{Oxaloacétate} + H_2O \xrightarrow{\text{CS}} \text{Citrate} + \text{CoA}$$

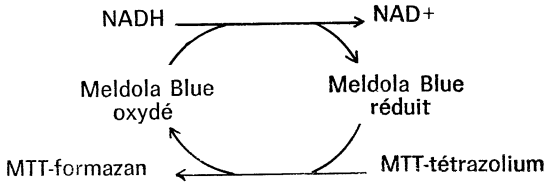
L'oxaloacétate nécessaire à la réaction (2) est formé à partir du malate et du NAD en présence de malate déshydrogénase :

$$\text{(3) Malate} + NAD^+ \underset{\text{MDH}}{\rightleftharpoons} \text{Oxaloacétate} + NADH + H^+$$

La détermination est basée sur la formation de NADH mesurée par l'augmentation de la densité optique à 340 nm. La quantité de NADH formé n'est pas directement proportionnelle à la concentration en acide acétique de l'échantillon puisqu'une réaction indicatrice auxilliaire (3) est utilisée (BERGMEYER, 1974).

En dosages manuels, cette méthode donne de bons résultats mais nécessite un calcul complexe tenant compte de la constante d'équilibre de la réaction (3), ce qui rend fastidieuse la détermination d'un grand nombre d'échantillons. En analyse automatique, la concentration en acide acétique de l'échantillon est simplement déterminée par comparaison avec des solutions étalons d'acétate de sodium.

Afin d'éliminer l'interférence due aux composés phénoliques du vin, on effectue la mesure à une longueur d'onde où le vin présente l'absorption minimale. Nous utilisons un couplage avec une réaction d'oxydoréduction selon la technique décrite précédemment (LONVAUD-FUNEL et *al.*, 1980). Le NADH formé par la réaction (3) réduit un sel de tétrazolium, le MTT (3-(4,5 diméthyl thiazolyl-2) 2,5 diphényl tétrazolium bromide), en son sel de formazan qui 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-benzophénoxazine) :



DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE ADOPTEE

I — CASSETTE ANALYTIQUE

L'échantillon dilué dans du tampon triéthanolamine 0,04 M pH : 8,4, contenant du malate 0,03 M et du chlorure de magnésium 0,01 M est dialysé puis additionné du mélange réactionnel complet à l'exception de la suspension contenant la malate déshydogénase et la citrate synthase. Celle-ci est ajoutée séparément pour déclencher la réaction de formation du NADH. Après passage dans un bain marie à 37 °C, le flux reçoit le mélange MTT-Meldola Blue. Après réaction environ 5 minutes, le flux arrive au colorimètre où l'on enregistre la densité optique à 570 nm. Le diagramme des flux est représenté sur la figure 1.

Il n'est pas possible d'ajouter le mélange réactionnel complet en une seule injection car cela provoque une dérive de la ligne de base et rend la réaction peu sensible. Il se produit vraisemblablement une hydrolyse spontanée de l'oxaloacétate avant réaction sur l'acétylcoA. L'injection séparée de l'acétylcoA synthétase a le même effet. De plus, cette enzyme est très instable en suspension diluée.

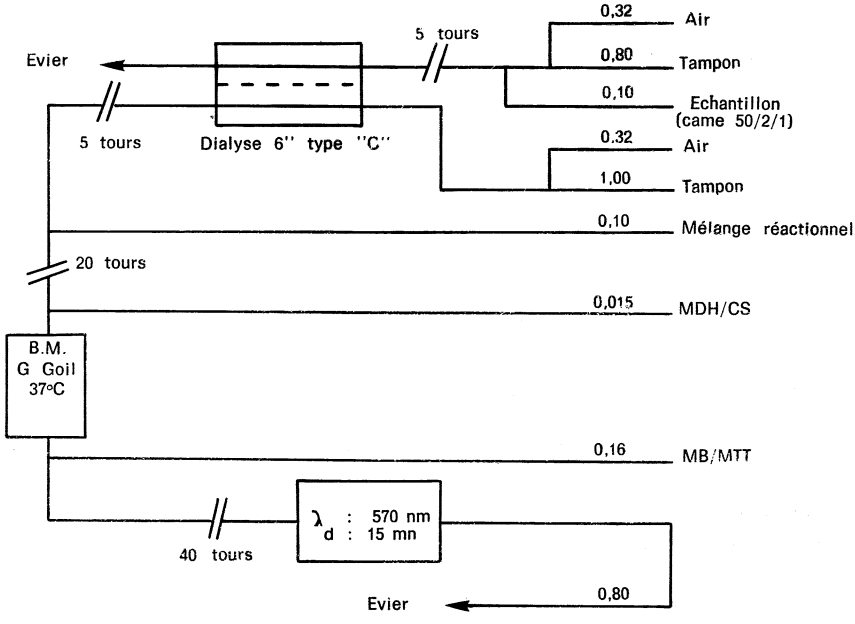


Fig. 1. — Diagramme des flux.

II — COMPOSITION DES REACTIFS

1. **Préparation du tampon triéthanolamine 0,004 M.**

0,75 g de triéthanolamine hydrochloride, 0,42 g d'acide L-malique et 0,21 g de chlorure de magnésium dissous dans l'eau distillée, ajusté à pH 8,4 avec de la potasse 2 N et complété à 1 litre. Addition de 1 ml de Brij 35. Le tampon est stable 3 semaines à + 4 °C.

2. **Préparation du mélange réactionnel.**

Le contenu des flacons 1, 2 et 4 du « coffret Acétate » Boehringer Mannheim sont mélangés et portés à un volume total de 80 ml.

Flacon 1 :

Tampon triéthanolamine 0,4 M, pH 8,4	32 ml
Acide L-malique	134 mg
$MgCl_2$	67 mg
Stabilisateurs	

Flacon 2 :

ATP lyophilisé	175 mg
CoA lyophilisé	18 mg
NAD lyophilisé	86 mg

Flacon 4 :

AcétylcoA synthétase lyophilisé	3 × 5 U

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

3. **Préparation de la suspension MDH/CS.**

Le contenu du flacon 3 du « coffret Acétate » (0,4 ml) est porté à 12 ml avec de l'eau distillée.

Cette suspension diluée est stable au moins 12 heures à température ambiante.

4. **Préparation du colorant.**

MTT (3-(4,5 diméthyl thiazolyl-2)-2,5 diphényl tétrazolium bromide	188 mg
Meldola Blue (8-diméthylamino-2,3-benzophénoxazine)	25 mg
HCl 12 N	10 ml
Triton X 100	25 ml
Eau distillée q.s.p.	1 000 ml

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

Remarque : Dans le « coffret Acétate « Boehringer Mannheim, l'acétylcoA synthétase, enzyme particulièrement instable, est présentée sous forme lyophilisée et répartie en trois flacons distincts. Ceci permet de préparer un mélange réactionnel portant sur un tiers seulement du volume total.

RESULTATS

I — COURBES D'ETALONNAGE

Nous avons calculé les équations des droites d'étalonnage correspondant à la gamme 0 à 1,2 g par litre pour différents rapports de flux échantillon sur flux tampon (Tableau I). L'optimum correspond au rapport 0,10/0,80 ; c'est à dire pour la plus faible quantité d'échantillon.

Dans le tableau II, nous donnons les équations des droites d'étalonnage correspondant aux gammes 0 à 0,8 et 0 à 1,2 g d'acide acétique par litre pour un rapport de flux 0,10/0,80. La meilleure corrélation est obtenue pour des teneurs en acide acétique inférieures à 1 g par litre.

TABLEAU I

Droites d'étalonnage de 0 à 1,2 g par litre d'acide acétique

Flux échantillon Flux tampon	Equation de la droite $y = ax + b$	Cœfficient de corrélation
0,23/0,80	27,5x + 57,7	0,9367
0,16/0,80	110,2x + 21,2	0,9488
0,10/0,80	150,4x + 22,3	0,9650

y = hauteur du pic en mm.
x = g d'acide acétique par litre.
Volume du mélange réactionnel : 100 ml.

TABLEAU II

Droites d'étalonnage de 0 à 0,8 g par litre et de 0 à 1,2 g par litre d'acide acétique

Gamme	Equation de la droite	Cœfficient de corrélation
0 à 0,8	y = 77,1x + 10,2	0,9967
	y = 80,8x + 4,2	0,9957
	y = 87,2x + 3,7	0,9945
	y = 84,3x + 3,2	0,9967
0 à 1,2	y = 67,5x + 13,1	0,9920
	y = 67,5x + 8,6	0,9883
	y = 72,5x + 8,6	0,9866
	y = 72,2x + 7,3	0,9908

Rapport des flux échantillon/tampon : 0,10/0,80.
Volume du mélange réactionnel : 80 ml.

TABLEAU III

Répétabilité de la méthode

n	Moyenne	Ecart-type	Erreur sur la moyenne (99 p. 100)
13	1,289	0,0095	0,0110
9	0,624	0,0053	0,0084
10	0,101	0,0060	0,0085
7	0,240	0,0082	0,0122
5	0,699	0,0216	0,0497
7	0,411	0,0146	0,0219

La dilution des enzymes dans le mélange réactionnel joue également un rôle. La linéarité de la réaction est meilleure pour un volume total du mélange réactionnel de 80 ml (Tableau II).

II — REPETABILITE

Dans le Tableau III, nous donnons les résultats pour n répétitions de 6 échantillons différents. Dans le cas le plus défavorable d'un même échantillon dosé à plusieurs jours d'intervalle, l'erreur relative est de l'ordre de 8 p. 100. En réalité, l'erreur maximale sur la moyenne calculée au seuil de confiance de 99 p. 100 n'est que de 0,050 g par litre. Cette précision semble très suffisante pour les besoins de l'analyse courante.

III — COMPARAISON AVEC D'AUTRES METHODES

Le Tableau IV permet la comparaison entre la méthode étudiée et d'autres méthodes de dosage. L'acidité volatile a été déterminée sur les 8 vins selon la méthode manuelle par entraînement à la vapeur et par méthode automatisée basée sur l'entraînement à l'azote. On constate que la détermination automatique de l'acide acétique par méthode enzymatique donne systématiquement des résultats plus faibles. Cette différence provient du fait que le vin, en plus de l'acide acétique, peut renfermer les acides propionique, butyrique et formique. Nous avons dosé les acides volatils autres que l'acide acétique par chromatographie en phase gazeuse (BERTRAND, 1981). La teneur de l'ensemble de ces acides varie de 0,005 à 0,05 g par litre exprimé en acide acétique pour la majorité des vins analysés. Dans le cas du vin N° 2 qui est altéré, la quantité des autres acides volatils est importante. Il paraît nécessaire de vérifier par méthode manuelle la teneur en acidité volatile d'un vin lorsque sa concentration en acide acétique est élevée.

TABLEAU IV

Comparaison avec d'autres méthodes de dosage de l'acidité volatile

VIN N°	ACIDITE VOLATILE Méthode manuelle par entraînement à la vapeur	ACIDITE VOLATILE Méthode automatisée par entraînement à l'azote	ACIDE ACETIQUE Méthode automatisée enzymatique
1	0,72	0,73	0,68
2	1,35	1,03	0,95
3	0,51	0,53	0,49
4	0,69	0,70	0,61
5	0,60	0,60	0,57
6	0,18	0,15	0,12
7	0,51	0,53	0,45
8	0,63	0,61	0,59

Les résultats sont exprimés en g d'acide acétique par litre.

Il existe apparemment une bonne concordance entre la méthode par entraînement à l'azote et la méthode enzymatique proposée. C'est pourquoi d'autres échantillons ont été analysés par ces deux techniques afin de les comparer plus précisement. Les résultats présentés sur la figure 2 montrent qu'il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes. Pour 40 échantillons analysés, on obtient la droite de régression $y = 1{,}064\ x - 0{,}155$, caractérisée par un cœfficient de corrélation $r = 0{,}989$ et un écart type lié $Sdy = 0{,}0069$.

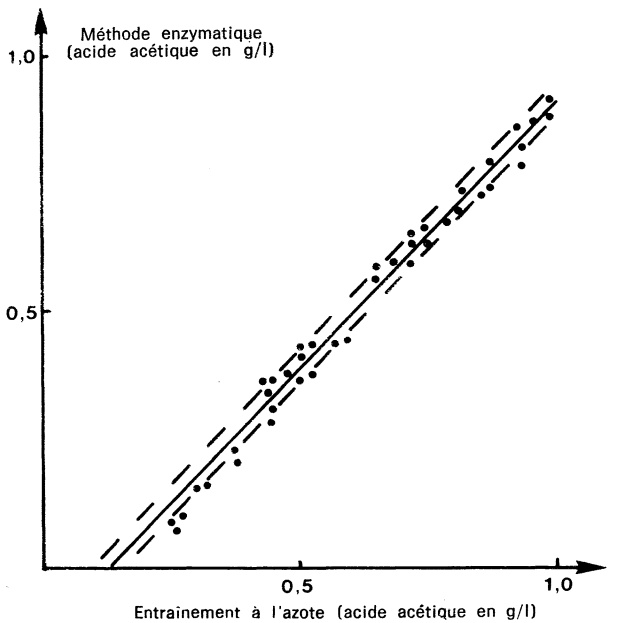


Fig. 2. — Corrélation entre les résultats de la méthode enzymatique de dosage de l'acide acétique et ceux de la méthode de dosage de l'acidité volatile par entraînement à l'azote.

IV — INFLUENCE DE DIFFERENTS CONSTITUANTS DU VIN

Nous avons constaté que les acides malique et citrique du vin n'ont pas d'effet sur la réaction enzymatique. L'addition d'acétate d'éthyle (jusqu'à 240 mg par litre) ou de sucres (jusqu'à 80 g par litre) ne modifie pas le résultat obtenu. Pour un titre alcoométrique compris en 8 et 14 p. 100 vol., l'éthanol n'a pas d'influence.

Par contre, l'addition d'anhydride sulfureux provoque une détermination erronée de la teneur en acide acétique (Tableau V). L'erreur par défaut provoquée par l'anhydride sulfureux ne devient supérieure à l'erreur sur la moyenne que pour des concentrations en anhydride sulfureux libre supérieures à 40 mg par litre. Lorsque les échantillons à doser ont une teneur plus élevée en anhydride sulfureux il est nécessaire de modifier le montage analytique. La solution la plus simple consiste en l'injection dans le flux

échantillon avant dialyse d'une solution d'hydrogène peroxyde 0,1 volume avec un débit de 0,1 ml par mn.

TABLEAU V

Influence de l'anhydride sulfureux sur la détermination de l'acide acétique par méthode enzymatique automatisée

Teneur initiale en mg/l SO_2 libre/SO_2 total	VIN N°			
	1	2	3	4
	7/12	6/68	10/152	32/168
Sans addition	0,62	0,25	0,11	0,43
+ 20 mg SO_2/l	0,58	0,21	0,09	0,41
+ 40 mg SO_2/l	0,56	0,19	0,08	0,39
+ 80 mg SO_2/l	0,57	0,10	0,06	0,37
+ 120 mg SO_2/l	0,57	0,07	0,06	0,30

Les résultats sont exprimés en g d'acide acétique par litre.

Une addition d'anthocyanes (jusqu'à 200 mg par litre) à un vin blanc n'a pas d'effet sur le dosage. Les tanins à forte concentration (supérieure à 3 g par litre) donnent des teneurs en acide acétique sous-estimées d'environ 5 p. 100. La défécation des échantillons ne peut être réalisée, car il existe une possibilité de combinaison de l'acétate avec certains composés phénoliques.

CONCLUSION

La détermination de l'acidité volatile par la méthode automatique par entraînement à l'azote ne peut se faire qu'à une faible cadence analytique, ce qui limite les performances des chaînes d'analyse en flux continu à paramètres multiples. L'automatisation de la méthode enzymatique conserve la sensibilité et la spécificité du dosage enzymatique manuel et permet de travailler à une cadence de 50 échantillons par heure. Les caractéristiques de la méthode telle que nous la décrivons sont satisfaisantes. La répétabilité est bonne et il existe une corrélation très étroite avec le dosage de l'acidité volatile par entraînement à l'azote.

Manuscrit reçu le 2 mai 1985 ; accepté pour publication le 19 août 1985.

RÉSUMÉ

Les auteurs présentent une méthode de dosage enzymatique automatisée en flux continu de l'acide acétique 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 acetic 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 stellen eine Methode vor zur automatischen Enzymdosierung des ununterbrochenen Flusses der azetischen Saüre im Wein. Uberlagerungen zu vermeiden wird die Bildurg von NADH mit 570 nm gemessen ; die beschriebene Methode bewahrt den spezifischen und sensibeln Charackter der manuellen Enzymmethode.

RESUMEN

Les autores presentan un método para la determinacion enzimatica del acido acético de los vinos. Se trata de un procedimiento automatizado de flujo continuo, en el que la formacion de NADH se mide a 570 nm con objeto de evitar posibles interferencias. El método descrito posee las mismas caractéristicas de especificidad y sensibilidad que el método enzymatico manual.

RIASSUNTO

Gli autori presentono un metodo di dosaggio enzimatico in flusso continuo dell'acido acetico nei vini. Per evitare le interferenze, la forma di NADH é misurata a 570 nm. Il metodo descrito mantiene i caratteri di specificità e di sensibilità del metodo enzimatico manuale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGMEYER H.-U., 1974. *Methods of enzymatic analysis,* p. 113-117. Verlag Chemie Weinheim ed., Academic Press, New York.

BERGMEYER H.-U. et MOLLERING H., 1974. Acetate - Determination with preceding indicator reaction, in *Methods of enzymatic analysis,* p. 1520-1528. Verlag Chemie Weinhem ed. Academic Press, New York.

BERTRAND A., 1981. Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité des vins. *C.R. Colloque Soc. Fr. Microbiologie,* p. 251-267, Reims.

LONVAUD-FUNEL A., DONECHE B. et BLEUZE D., 1980. Automatisation en flux continu du dosage enzymatique de l'acide malique des vins. *Connaissance Vigne Vin,* **14**, n° 4, 207-217.