

Dosage de l'acide acétique dans les vins et les moûts par méthode enzymatique manuelle

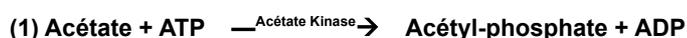
Marc DUBERNET, Matthieu DUBERNET, Françoise GRASSET
Laboratoires Dubernet, œnologie – 9, quai d'Alsace F-11100 Narbonne - France

1 Domaine d'application

Dosage enzymatique de l'acide acétique présent dans les vins et les moûts

2 Principe

En présence d'ATP, l'acide acétique est transformé en acétyl-phosphate dans une réaction catalysée par l'acétate kinase.



L'ADP formé par cette réaction est retransformé en ATP par réaction avec du phosphoénolpyruvate en présence de pyruvate kinase.

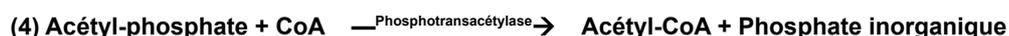


Le pyruvate est réduit en L-lactate par le nicotinamide-adénine-nucléotide réduit (NADH) en présence de lactate-déshydrogénase.



La quantité de NADH oxydé en réaction (3) est déterminée par la mesure de l'absorbance à 340 nm, et est proportionnelle à la concentration du vin en acide acétique.

Une quatrième réaction permet de maintenir l'équilibre de la réaction 1 dans le sens de formation d'acétylphosphate par élimination de ce dernier.



3 Appareillage

- Spectrophotomètre UV avec lecture à 340 nm. Affichage à 5 décimales, capacité de lecture au moins égale à 4 unités d'absorbance.
- Cuves en verre ou à usage unique de 1 cm de trajet optique.
- Micropipettes permettant de prélever des volumes de 0,020 à 2 ml.
- Etuve ou bain marie à 30°C

4 Réactifs et produits

4.1 Produits

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

n° ref	Nom	Référence CAS	Présentation
(1)	Acétate kinase (AK)	CAS [9027-42-5]	Poudre ou solution > 750 U.mL ⁻¹

(2)	Pyruvate kinase (PK) Lactate déshydrogénase (LDH)	CAS [9001-59-6] CAS [9001-60-9]	Mélange en suspension des deux enzymes dans 5 ml : PK 700 U.mL ⁻¹ , LDH 1000 U.mL ⁻¹ .
(3)	Phosphotransacétylase (PTA)	CAS [9029-91-8]	Poudre lyophilisée 1000 U
(4)	4-Morpholine-propanesulfonic acid (MOPS)	CAS [1132-61-2]]	
(5)	Adénosine 5 triphosphate disodium salt (ATP)	CAS [987-65-5]	
(6)	Tricyclohexylammonium phosphoenolpyruvate (PEP)	CAS [35556-70-8]	
(7)	β Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form) (NADH)	CAS [1132-61-2]	Grade 1 ≥ 98%
(8)	Coenzyme A trilithium salt	CAS [18439-24-2]	Grade 2
(9)	Chlorure de magnésium MgCl ₂ , 6H ₂ O	CAS [7791-18-6]	
(10)	Chlorure de potassium (KCl)	CAS [7447-40-7]	
(11)	Polyvinylpyrrolidone PVP	CAS [9003-39-8]	
(12)	KOH	CAS [1310-58-3]	

4.2 Eau

Utiliser de l'eau ultra pure de qualité classe 1, telle que définie dans l'ISO 3696.

4.3 Préparation des réactifs

- Tampon MOPS :

Préparation pour 100 ml

- 4330 mg de MOPS (4)
- 165 mg de MgCl₂, 6 H₂O (9)
- 500 mg de KCl (10)
- 80 ml d'eau déminéralisée classe 1.
- Ajuster le pH à 7,45 avec du KOH 1,5 N (soit 25,2 g dans 300 ml d'eau déminéralisée) (12).
- Attendre 5 minutes pour que le pH se stabilise et si nécessaire le réajuster.
- Qsp 100 ml d'eau déminéralisée classe 1.

Validité du tampon : 2 mois

- Acétate kinase :

Si le produit est sous forme poudre, préparer 1 ml de suspension aqueuse dans de l'eau ultra pure, à une concentration ≥ 750 U.mL⁻¹

- Phosphotransacétylase

Mettre en suspension 1000 U de PTA (3) dans 1 mL d'eau ultra pure.

Validité de la PTA en suspension : 5 jours

- Réactif A :

Dans 80 ml de tampon MOPS, dissoudre :

- 300 mg d'ATP (5)
- 50 mg PEP (6)
- 40 mg de NADH (7)
- 25 mg de CoA (8)
- 1000 mg de PVP (11)

- qsp 100 ml tampon MOPS

Stabilité de ce réactif A₁ : 24 heures.

Au dernier moment, incorporer :

- 170 µl de suspension de PK / LDH (2).
- 500 µl de suspension de PTA (3)

Stabilité du réactif A₂ : 8 heures

- Réactif B :

- Acétate kinase en suspension (1).

5 Préparation de l'échantillon

Le dosage s'effectue directement sur le vin ou le moût. Cependant, les valeurs de concentration de l'acide acétique ne doivent pas dépasser 0.80 g.L⁻¹. Pour les valeurs plus fortes, il convient de procéder à une dilution préalable de l'échantillon.

6 Mode opératoire

6.1 Etapes de l'analyse

	BLANC	ECHANTILLON
1	Incorporer dans la cuve 3 mL de réactif A2	Incorporer dans la cuve 3 mL de réactif A2
2	Faire le zéro de l'instrument avec la cuve et le réactif A2	
3	Incorporer 50 µl d'eau distillée	Incorporer 50 µl d'échantillon vin
4	Homogénéiser, et lire l'absorbance E₀blanc	Homogénéiser, et lire l'absorbance E₀échantillon
5	Incorporer 20 µl de réactif B	Incorporer 20 µl de réactif B

6

Boucher la cuve avec un film,
homogénéiser et la mettre à 30°C
pendant 40 minutes.
Lire l'absorbance $E1_{\text{blanc}}$.
Refaire la lecture 5 minutes après
pour vérifier la fin de la réaction

Boucher la cuve avec un film,
homogénéiser et la mettre à 30°C
pendant 40 minutes.
Lire l'absorbance $E1_{\text{échantillon}}$.
Refaire la lecture 5 minutes après
pour vérifier la fin de la réaction

7 Calcul

La mesure doit se faire au plateau réactionnel. Il est donc important que la réaction soit complète.

La concentration en gramme par litre d'acide acétique est calculée par la formule générale :

$$C \ll \frac{V.PM}{d.v.1000} \mathcal{A}$$

V = Volume du test en ml, soit 3.07 ml
 v = Volume de l'échantillon en ml, soit 0.05 ml
 PM = Masse moléculaire de la substance à doser. Acide acétique = 60.05
 d = Trajet optique de la cuvette en centimètre 1 cm
 ε = Coefficient d'absorption du NADH à 340 nm, $\varepsilon = 6.3 \text{ mmole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

$$\mathcal{A} = \mathcal{A}_{\text{échantillon}} - \mathcal{A}_{\text{blanc}} = (E0_{\text{échantillon}} - E1_{\text{échantillon}}) - (E0_{\text{blanc}} - E1_{\text{blanc}})$$

Pour l'acide acétique dans les conditions employées :

$$C \ll 0.5852 \mathcal{A} \text{ (g.L}^{-1} \text{ d'acide acétique).}$$

8 Validation de la méthode

8.1 Etude de l'erreur systématique

8.1.1 Linéarité

A partir d'un vin, une gamme d'échantillon est créée couvrant la gamme de 0.29 à 1.27 g.L⁻¹ d'acide acétique, par ajouts dosés. Les valeurs de référence sont obtenues par pesée de précision d'acide acétique pur.

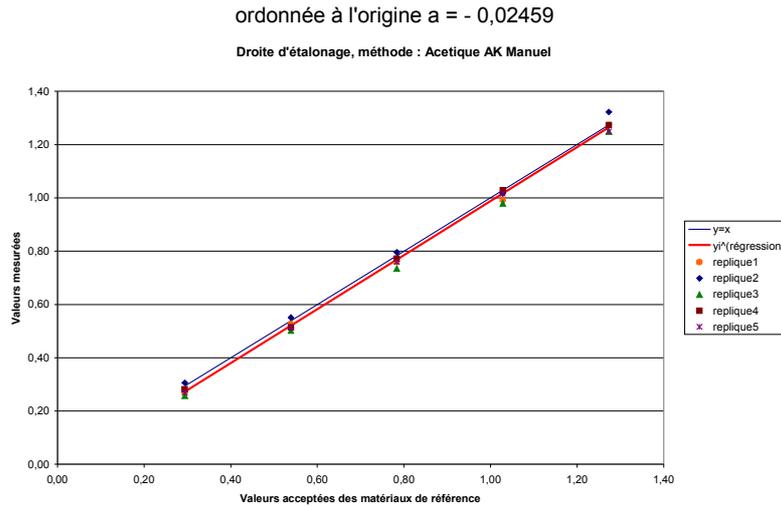
Ces 5 échantillons sont analysés 5 fois en conditions de reproductibilité. Les échantillons contenant des teneurs théoriquement supérieures à 0.80 g.L⁻¹ d'acide acétique ont été préalablement dilués selon les recommandations données en 5.

	Ti (ref)	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
1	0,29	0,27	0,31	0,26	0,28	0,27
2	0,54	0,53	0,55	0,50	0,51	0,51
3	0,78	0,76	0,80	0,73	0,77	0,76
4	1,03	0,99	1,02	0,98	1,03	1,02
5	1,27	1,27	1,32	1,25	1,27	1,25

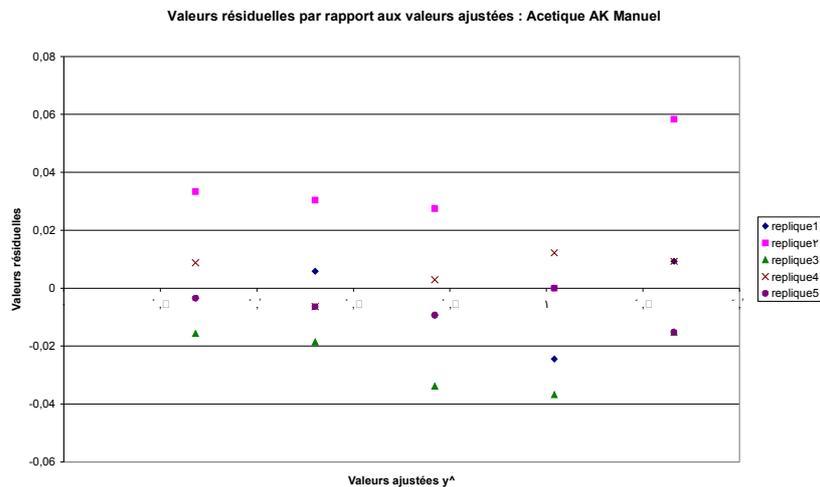
La droite d'étalonnage calculée est la suivante :

$$\text{Droite (y = a + b*x)}$$

$$\text{pente b = 1,012}$$



La représentation graphique des résidus (écart entre la valeur mesurée et la valeur de régression) est un outil permettant d'apprécier graphiquement le caractère linéaire de la méthode.



La répartition des résidus est aléatoire et homogène de part et d'autre de l'axe des abscisses. La méthode peut donc être considérée comme linéaire.

Ceci est confirmé par le test de linéarité selon la norme ISO 11095.

Ecart type de reproductibilité expérimentale SR = 0,02231	
Reproductibilité expérimentale R = 0,06247	
Ecart type d'erreur résiduelle = 0,02192	
Ecart type du défaut d'ajustement = 0,01907	
Coefficient de corrélation (r) = 0,99982	
Interprétation, test de Fischer-Snedecor	
Test : F_obs = 0,73	> F = 3,1
Inégalité non vérifiée	
On ne peut pas confirmer la non linéarité	

La linéarité de la méthode enzymatique manuelle et absolue du dosage de l'acide acétique est vérifiée.

8.1.2 Etude de la justesse de la méthode

La justesse de la méthode est étudiée par comparaison aux valeurs acceptées comme référence de matériaux de référence.

8.1.2.1 Comparaison aux valeurs de formulation de solutions synthétiques

Pour cette étude, ont été combinés deux types de matériaux de référence : d'une part des ampoules de vin dont la valeur de référence est issue de chaînes interlaboratoires, et d'autre part des solutions synthétiques dont les valeurs ont été données par formulation précise à partir de matériel raccordé par étalonnage. Les échantillons contenant des teneurs théoriquement supérieures à 0.80 g.L⁻¹ d'acide acétique ont été préalablement dilués selon les recommandations données en 5.

	Val_ref	Val_1	Val_2	Moy_alt	di=alt-ref
1	0,31	0,29	0,31	0,30	-0,01
2	0,61	0,59	0,59	0,59	-0,02
3	1,22	1,19	1,19	1,19	-0,04
4	0,21	0,20	0,21	0,20	-0,01
5	0,36	0,36	0,37	0,36	0,01
6	0,40	0,39	0,37	0,38	-0,02
7	0,58	0,55	0,55	0,55	-0,02
8	0,80	0,76	0,76	0,76	-0,04

Ecart moyen, Md = - 0,0191

Ecart type des écarts, Sd = 0,0155

Zscore = 1,2342 < 2

L'accord des résultats de la méthode enzymatique avec les valeurs de référence de matériaux de référence est concordant.

8.2 Etude de la fidélité

8.2.1 Répétabilité de la méthode

30 échantillons ont été analysés en double dans des conditions de répétabilité. Les échantillons contenant des teneurs théoriquement supérieures à 0.80 g.L⁻¹ d'acide acétique ont été préalablement dilués selon les recommandations données en 5.

	Analyse N°1	Analyse N°2	Wi	Wi^2
1	0,37	0,37	0,00	0,00
2	0,36	0,36	0,00	0,00
3	0,47	0,47	0,00	0,00
4	0,77	0,76	0,01	0,00
5	0,72	0,72	0,00	0,00
6	0,21	0,22	-0,01	0,00
7	0,29	0,28	0,01	0,00
8	0,22	0,22	0,00	0,00
9	0,66	0,65	0,01	0,00
10	0,59	0,59	0,00	0,00
11	0,64	0,65	-0,01	0,00
12	0,61	0,62	-0,01	0,00
13	1,40	1,43	-0,04	0,00
14	0,55	0,56	-0,01	0,00
15	0,84	0,84	0,00	0,00
16	1,00	1,04	-0,04	0,00
17	1,15	1,15	0,00	0,00
18	0,99	1,02	-0,02	0,00
19	0,29	0,29	0,00	0,00
20	0,29	0,29	0,00	0,00
21	0,26	0,26	0,00	0,00
22	0,45	0,43	0,02	0,00
23	0,91	0,86	0,05	0,00
24	0,60	0,59	0,01	0,00

25	0,67	0,71	-0,04	0,00
26	0,50	0,47	0,04	0,00
27	0,44	0,47	-0,02	0,00
28	0,70	0,69	0,01	0,00
29	0,56	0,55	0,01	0,00
30	0,61	0,62	-0,01	0,00

$$\begin{aligned} S_r &= 0,014 \\ r &= 0,038 \end{aligned}$$

La différence absolue entre deux résultats d'essai indépendants, obtenus par la même méthode, sur un matériau d'essai identique, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement pendant un court intervalle de temps, ne sera pas supérieure à 0.038 g.L⁻¹ d'acide acétique dans plus de 5 % des cas.

8.2.2 Reproductibilité interlaboratoire

Une étude de reproductibilité interlaboratoire a été réalisée entre deux laboratoires. 10 échantillons ont été analysés par les deux laboratoires de façon indépendante.

	labo1		labo2		x	y	x-y
	x ₁	x ₂	y ₁	y ₂			
1	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,21	0,00
2	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,00
3	0,39	0,39	0,38	0,38	0,39	0,39	0,01
4	0,44	0,49	0,51	0,48	0,47	0,50	-0,04
5	0,59	0,61	0,62	0,61	0,60	0,62	-0,02
6	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,00
7	0,77	0,81	0,78	0,78	0,79	0,80	-0,01
8	0,91	0,96	1,02	1,02	0,93	0,99	-0,06
9	1,05	1,05	0,97	1,02	1,05	1,01	0,04
10	1,32	1,35	1,30	1,30	1,33	1,32	0,01

$$\begin{aligned} S_R &= 0,030 \\ R &= 0,08 \end{aligned}$$

La différence absolue entre deux résultats d'essai indépendants, obtenus par la même méthode, sur un matériau d'essai identique, dans différents laboratoires, avec différents opérateurs utilisant des équipements différents, ne sera pas supérieure à 0.08 g.L⁻¹ d'acide acétique dans plus de 5% des cas.

Bibliographie

DONECHE B., et SANCHEZ P.J., 1985 : Automatisation en flux continu du dosage enzymatique de l'acide acétique dans les vins, *Connaissance de la vigne et du vin*, 1985 ; n°3, 161-169.

DUBERNET M., PENNEQUIN F. et GRASSET F., 1997 Adaptation du dosage de l'acide acétique dans les vins sur analyseur séquentiel Hitachi 717, *Feuillet vert OIV N°1001*

McCLOSKEY Leo P., 1980 : An improved enzymatic assay for acetate in juice and wine, *Am. J. Enol. Vitic. Vol 31, N° 2, 1980, pp 170-173.*

Norme ISO 5725 : 1994 – Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure, *indice de classement X 06-041-1*

Norme ISO 11095 : 1996 – Etalonnage linéaire utilisant des matériaux de référence, *Numéro de référence ISO 11095 :1996*

OIV, 2001 – Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts ; *OIV Ed., Paris.*