

LE DOSAGE DE L'ACIDE D(+)-MALIQUE DANS LES VINS AVEC DES FAIBLES TENEURS, EN EMPLOYANT LA METHODE ENZYMATIQUE

O DOSEAMENTO DO ÁCIDO D(+)-MÁLICO EM VINHOS COM BAIXOS TEORES, EMPREGANDO O MÉTODO ENZIMÁTICO

Madalena Machado^{1,2}, A.S.Curvelo-Garcia¹

¹ Estação Vitivinícola Nacional. INIA. 2565-191 Dois Portos. Portugal.
E-mail: inia.evn@mail.telepac.pt

² Escola Superior Agrária de Santarém. IPS. 2000 Santarém. Portugal

RESUME

Il est étudiée l'application de la méthode enzymatique pour doser l'acide D(+)-malique dans les vins pour des faibles concentrations. La modification proposée est basée dans l'adjonction préalable de 50 mg/l de cet isomère. La méthode ainsi modifiée est applicable pour les concentrations de 0 à 70 mg/L, et équivalent à la méthode déjà décrite pour les concentrations supérieures à 50 mg/L, en ce qui concerne les paramètres de validation.

Mots clés: Vins, acide D(+)-malique, méthode d'analyse enzymatique

Palavras chave: Vinhos, ácido D(+)-málico, método analítico enzimático

INTRODUCTION

La présence naturelle de l'acide D(+)-malique dans les raisins, les moûts et les vins a été signalée il y a seulement cinq années (Chretien et Sudraud, 1993, 1994); selon ces auteurs, les teneurs de cet isomère de l'acide malique dans les vins sont toujours inférieures à 100 mg/L, ne sont pas influencées par la fermentation malolactique, mais pourront diminuer pendant la fermentation alcoolique par une éventuelle consommation par les levures. D'autre-part, Delfini *et al.* (1995) ont démontré la possibilité de production de cet isomère par les levures *Schizosaccharomyces*.

L'importance du dosage de l'acide D(+)-malique dans les vins est

essentiellement associée au contrôle de l'éventuelle acidification avec l'acide DL-malique. Ainsi, pendant les dernières années, il a été une préoccupation de l'OIV la fixation d'une valeur limite pour la présence naturelle, dans les vins, de l'isomère D(+) de l'acide malique et, évidemment, la définition de sa méthode analytique.

La méthode aujourd'hui décrite par l'OIV (OIV, 1998) pour la détermination de l'acide D(+)-malique dans les vins est une méthode enzymatique, basée dans l'oxydation de l'acide D(+)-malique (D-malate) par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) en oxaloacétate qui est transformé en pyruvate et dioxyde de carbone; la formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de D-malate présente.

Encore selon l'OIV (1998), *“les valeurs d'acide D(+)-malique inférieures à 50 mg/L doivent être confirmées par une autre méthode d'analyse utilisant un autre principe de mesure, par exemple celle de Przyborski et al. (1993)”*.

Cette méthode est une méthode chromatographique, utilisant une phase stationnaire *“chirale”*, de l'ester méthylique de l'acide D(+)-malique. C'est une méthode encore pas validée (OIV, 1998) et très peu répandue dans les laboratoires de contrôle. D'autre-part, on devra avoir toujours présent que la plupart des vins contient des teneurs d'acide D(+)-malique inférieures à 50 mg/L.

Ainsi, il nous paraît évident la nécessité de conduire les études pour l'élargissement de l'application de la méthode enzymatique aux faibles teneurs, inférieures à 50 mg/L, ce qu'il objectif de ce travail.

MATERIEL ET METHODES

Sur quatre vins différents (deux vins blancs et deux vins rouges), on a appliqué la méthode enzymatique décrite par l'OIV (1998) pour la détermination de l'acide D(+)-malique et la même méthode après l'introduction dans la cuve d'une quantité d'acide D(+)-malique équivalente à 50 mg/L (introduction de 0.025 mL d'une solution d'acide D(+)-malique à 0.199 g/l, en substitution du volume équivalent de l'eau); dans ce cas, les valeurs obtenues sont diminuées de 50 mg/L. Pour chaque échantillon, sans et avec l'adjonction d'acide D(+)-malique, on a fait dix déterminations indépendantes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le tableau I, on présente les résultats obtenus pour chaque échantillon de vin, avec et sans une préalable adjonction d'acide D(+)-malique.

TABLEAU I

Teneurs en acide D(+)-malique de quatre vins, sans et avec la préalable adjonction de cet isomère (mg/L)

Teores em ácido D(+)-málico de quatro vinhos, sem e com uma prévia adição deste isómero (mg/L)

		valeur moyenne (mg/L)	Ecart-type (mg/L)	Coef. Variation (%)	Teneur obtenue (mg/L)
vin blanc 1	sans adjonction	13	4.2	31.3	13
	avec adjonction	62	4.5	7.2	12
vin blanc 2	sans adjonction	7	2.6	39.1	7
	avec adjonction	56	2.5	4.4	6
vin rouge 1	sans adjonction	41	3.7	8.9	41
	avec adjonction	97	4.1	4.2	47
vin rouge 2	sans adjonction	14	2.9	21.5	14
	avec adjonction	60	4.5	7.6	10

Ces résultats pourront alors suggérer, en tenant compte surtout les coefficients de variation et les teneurs obtenues, que la méthode est significativement améliorée avec l'adjonction préalable d'acide D(+)-malique pour les cas, bien fréquents, de teneurs inférieures à 50 mg/L.

Ainsi, dans le tableau II, on présente un résumé du dossier de validation de cette nouvelle méthode.

TABLEAU II

Résumé du dossier de validation interne de la méthode de dosage de l'acide D(+)-malique après la préalable adjonction de 50 mg/L de cet isomère

Resumo dos dados de validação interna do método de doseamento do ácido D(+)-málico após a prévia adição de 50 mg/L

Gamme de travail	50 mg à 120 mg d'acide D(+)-malique par litre. Dans ces limites, la méthode est linéaire, avec un coefficient de corrélation entre 0.990 et 0.994
Limite de quantification	24.4 mg/L
Limite de détection	8.3 mg/L
Sensibilité	0.0015 abs / mg/L
Taux de récupération	87.5 à 115.0% pour les vins blancs et 75 à 105% pour les vins rouges
Répétabilité	≤12.4 mg/L pour les vins blancs (selon la méthode OIV, ≤12.5 mg/L) ≤12.6 mg/L pour les vins rouges (selon la méthode OIV, ≤12.7 mg/L)
Coefficient de variation	4.2% à 7.6% (vins blancs et vins rouges)
Variabilité intralaboratoire	CV=7.4% (σ =4.4 mg/L; $X_{moyenne}$ =59.3 mg/L)

CONCLUSIONS

La méthode proposée est la méthode décrite par l'OIV (1998) avec la modification suivante: introduction, dans la cuve, de 0.025 mL d'une solution d'acide D(+)-malique à 0.199 g/L, en substitution du volume équivalent de l'eau (ce qui correspond à une adjonction de 50 mg/l de cet isomère de l'acide malique à l'échantillon).

Selon les résultats obtenus, on pourra conclure que cette méthode est applicable pour les concentrations de 50 à 120 mg/L (après l'ajoute d'acide D(+)-malique), donc pour les concentrations dans l'échantillon à analyser de 0 à 70 mg/L. La fiabilité et les autres caractéristiques de la méthode sont équivalentes aux valeurs de la méthode de l'OIV (1998). Ainsi, il est possible analyser avec la méthode enzymatique les vins qui contiennent des faibles teneurs d'acide D(+)-malique, ce qui est la plupart des cas.

REMERCIEMENTS

On remercie le soutien financier de l'*Escola Superior Agrária de Santarém* et du Programme PAMAF-IED (EVN, INIA) dans le développement de ces travaux.

RESUMO

O doseamento do ácido D(+)-málico em vinhos com baixos teores, empregando o método enzimático

É estudada a aplicação do método enzimático para o doseamento do ácido D(+)-málico dos vinhos para fracas concentrações. A modificação proposta baseia-se na prévia adição de 50 mg/l deste isómero. O método assim modificado é aplicável para concentrações de 0 a 70 mg/L, com parâmetros de validação equivalentes aos do método já descrito para concentrações superiores a 50 mg/L.

SUMMARY

The determination of D(+)-malic acid in wines for low concentrations using the enzymatic method

It's studied the application of the enzymatic method to determining the D(+)-malic acid content in wines for low concentrations. The modification proposed is based on a previous addition of this isomer (50 mg/L). This method modified is applicable for concentrations of 0 to 70 mg/L, with validation parameters equivalents to the method described for concentrations upper 50 mg/L.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chretien D., Sudraud P., 1993. Présence naturelle d'acide D(+)-malique dans les moûts et les vins, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 27: 147-149.

Chretien D., Sudraud P., 1994. Présence naturelle d'acide D(+)-malique dans les moûts et les vins, *Feuillet Vert de l'OIV*, 966.

Delfini C., Gaetano G., Gaia P., Piangerelli M.G., Cocito C., 1995. Production of D(+)-malic acid by wine yeasts, *Rivista de Viticoltura e di Enologia*, **48**: 75-76.

OIV, 1998. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Mise à jour Septembre 1998*. OIV, Paris.

Przyborski H., Wacha C., Bandion F., 1993. Zur bestimmung von D(+)-malic acid in wine, *Mitteilung Klosterneuburg*, **43**: 215-218.