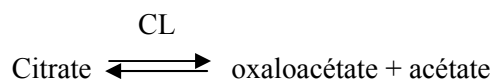


## Acide citrique

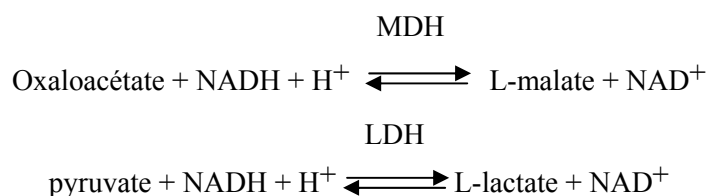
### Méthode enzymatique

#### 1 Principe de la méthode

L'acide citrique est transformé en oxaloacétate et acétate dans une réaction catalysée par la citrate-lyase (CL) :



En présence de la malate-déshydrogénase (MDH) et de la lactate-déshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en L-malate et en L-lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) :



La quantité de NADH oxydé en NAD<sup>+</sup> dans ces réactions est proportionnelle au citrate présent. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde 340 nm.

#### 2 Appareillage

- 2.1 Spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.  
À défaut, photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm
- 2.2. Cuves de verre de 1 cm de trajet optique ou cuves à usage unique.
- 2.3. Micropipettes permettant de prélever des volumes allant de 0,02 à 2 ml.

#### 3. Réactifs

- 3.1. Tampon pH 7,8 (glycylglycine 0,51 M ; pH = 7,8 ; Zn<sup>2+</sup> : 0,6 × 10<sup>-3</sup> M) :  
Dissoudre 7,13 g de glycylglycine dans environ 70 ml d'eau bidistillée.

Ajuster le pH à 7,8 avec environ 13 ml de solution d'hydroxyde de sodium 5 M ; ajouter 10 ml de solution de chlorure de zinc ZnCl<sub>2</sub>, à 80 mg dans 100 ml et porter à 100 ml avec de l'eau bidistillée.

La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

- 3.2. Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH), environ  $6 \cdot 10^{-3}$  M : dissoudre 30 mg de NADH et 60 mg de NaHCO<sub>3</sub> avec 6 ml d'eau bidistillée. La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.
- 3.3. Solution de malate déshydrogénase/lactate déshydrogénase, (MDH/LDH) (0,5 g MDH/ml ; 2,5 mg LDH/ml) : on fait un mélange de 0,1 ml MDH (5 g MDH/ml), 0,4 ml de solution de sulfate d'ammonium (3,2 M) et 0,5 ml LDH (5 mg/ml).  
Cette suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.
- 3.4. Solution de citrate-lyase CL (5 mg de protéine/ml). Dissoudre 168 mg de lyophilisat dans 1 ml d'eau glacée. La solution est stable pendant au moins une semaine à + 4 °C et pendant au moins 4 semaines sous forme congelée.  
Il est recommandé de procéder, préalablement au dosage, à la vérification de l'activité de l'enzyme.
- 3.5. Polyvinylpyrrolidone (PVPP) (*Voir Codex œnologique international*).

*Remarque* : L'ensemble des réactifs nécessaires pour ce dosage est disponible dans le commerce.

#### **4. Préparation de l'échantillon**

Le dosage du citrate s'effectue généralement directement sur le vin sans décoloration préalable et sans dilution, à condition que la teneur en acide citrique soit inférieure à 400 mg/l. Sinon, procéder à la dilution du vin de manière que la concentration en citrate se situe entre 20 et 400 mg/l (quantité de citrate dans la prise d'essai comprise entre 5 µg et 80 µg).

Dans le cas de vins rouges riches en composés phénoliques, il est recommandé de le traiter au préalable par la PVPP : mettre en suspension dans l'eau 0,2 g environ de PVPP, laisser reposer 15 minutes. Filtrer sur filtre plissé.

À 10 ml de vin placé dans une fiole conique de 50 ml, ajouter la PVPP humide prélevée à la spatule sur le filtre. Agiter pendant 2 à 3 minutes. Filtrer.

#### **5. Mode opératoire**

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340 nm, les mesures d'absorbance se font dans les cuves de 1 cm, l'absorbance zéro étant réglée par rapport à l'air (pas de cuve sur le trajet optique).

Dans les cuves de 1 cm d'épaisseur, introduire :

	Témoin	Dosage
Solution 3.1 .....	1,00 ml	1,00 ml
Solution 3.2 .....	0,10 ml	0,10 ml
Echantillon .....	-	0,20 ml
Eau bidistillée .....	2,00 ml	1,80 ml
Solution 3.3 .....	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger ; après environ 5 minutes, lire les absorbances des solutions témoin et dosage ( $A_1$ ).

Ajouter :

Solution 3.4 .....	0,02 ml	0,02 ml
--------------------	---------	---------

Mélanger ; attendre la fin de la réaction (environ 5 min.) et lire les absorbances des solutions témoin et dosage ( $A_2$ ).

Déterminer les différences d'absorbances ( $A_1-A_2$ ) du témoin et du dosage.

Déduire la différence d'absorbances du témoin de la différence d'absorbances du dosage :  $\Delta A_D$  and  $\Delta A_T$ .

*Remarque* : Le temps nécessaire à l'action des enzymes peut varier d'un lot à l'autre. Il n'est donné ci-dessus qu'à titre indicatif. Il est recommandé de le déterminer pour chaque lot.

## 6. Expression des résultats

La concentration en acide citrique est donnée, en milligrammes par litre (mg/l) sans décimale.

### 6.1. Mode de calcul

La concentration en milligrammes par litre est donnée par la formule générale :

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times \delta \times v} \times \Delta A$$

V = volume du test en millilitres (ici 3,14 ml)

v = volume de l'échantillon en millilitres (ici 0,2 ml)

PM = masse moléculaire de la substance à doser (ici, acide citrique anhydre = 192,1)

$\delta$  = trajet optique de la cuve en centimètres (ici 1 cm)

$\varepsilon$  = coefficient d'absorption du NADH ; à 340 nm,

$$\varepsilon = 6.3 \text{ mmole}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}$$

on obtient :

$$C = 479 \times \Delta A$$

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

*Remarque* :

- Mesure à 334 nm :  $C = 488 \times \Delta A$  ( $\epsilon = 6,3 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ ).
- Mesure à 365 nm :  $C = 887 \times \Delta A$  ( $\epsilon = 3,4 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ ).

6.2. Répétabilité (r)

Teneur en acide citrique inférieure à 400 mg/l :  $r = 14 \text{ mg/l}$ .

Teneur en acide citrique supérieure à 400 mg/l :  $r = 28 \text{ mg/l}$ .

6.3. Reproductibilité (R)

Teneur en acide citrique inférieure à 400 mg/l :  $R = 39 \text{ mg/l}$ .

Teneur en acide citrique supérieure à 400 mg/l :  $R = 65 \text{ mg/l}$ .

**BIBLIOGRAPHIE**

MAYER K. et PAUSE G., *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1969, **2**, 143

JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.*, 1970, n° 364

BOEHRINGER, Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire*, documentation technique.

VAN DEN DREISCHE S. et THYS L., *F.V., O.I.V.*, 1982, n° 755.