

TP1 QUELQUES ASPECTS DE LA BIOCHIMIE DU VIN (80 points)

Durée : 3 h30

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début de séance.

Le vin est, selon sa définition légale, "le produit de la fermentation du raisin frais ou du jus de raisin frais". C'est donc un produit biologique, résultat d'une biochimie passant par les étapes de fermentation alcoolique levurienne puis fermentation malolactique bactérienne.

La fermentation principale des sucres du raisin - le glucose et le fructose - est la fermentation alcoolique effectuée par les levures: mais environ 10% de ces sucres suivent la voie de la fermentation glycécopyruvique avec formation de glycérol et autres produits secondaires.

D'autre part, une fois la fermentation alcoolique terminée, le vin présente un excès d'acidité dû à deux principaux acides venant du raisin :

- l'acide tartrique, biologiquement stable,
- l'acide malique.

Va alors se produire la fermentation malolactique par les bactéries lactiques, permettant de transformer l'acide malique, qui est un diacide, en acide lactique qui est un monoacide. L'acidité est alors fortement diminuée et le vin devient plus moelleux.

Les qualités du vin dépendent donc en partie des qualités initiales du raisin: taux de sucres (S) et acidité (A). Les praticiens déterminent ainsi la date optimum pour la récolte du raisin en fonction du rapport S/A.

La manipulation comporte trois parties indépendantes :

Les deux premiers dosages sont effectués à partir d'un jus de raisins issus d'un prélèvement sur vigne en vue de la détermination du rapport S/A :

1. Dosage des sucres réducteurs par méthode colorimétrique à l'acide dinitrosalicylique (méthode au DNS)
2. Évaluation de l'acidité totale par méthode pH-métrique.

Le troisième dosage est effectué sur un vin arrivé à maturité

3. Dosage du glycérol par méthode enzymatique.

1. DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR METHODE COLORIMETRIQUE AU DNS (36 points).

Le 3,5-DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) forme quantitativement, à chaud, avec les sucres réducteurs un dérivé rouge orangé dont l'absorbance est mesurée à 530nm.

Le développement de la coloration à 100°C et les mesures d'absorbance devront être menés simultanément pour les essais et étalons.

Cette réaction n'est pas stoechiométrique et est liée au temps d'incubation à 100 °C ; le candidat veillera donc :

- à placer ses tubes dans un bain marie à ébullition, avec un niveau d'eau dépassant le niveau de liquide dans les tubes,
- à mesurer le temps d'incubation à 100°C avec précision,
- à refroidir immédiatement après la sortie du bain marie dans un bain d'eau froide.

1.1. Dosage des sucres réducteurs du Jus de raisin

Le jus a subi une décoloration préalable par passage sur noir animal pour éviter les colorations parasites.

Méthode générale de préparation des solutions colorées :

- Dans un tube à essais, verser :
 - v cm³ de solution apportant les sucres à doser,
 - compléter à 3 cm³ avec de l'eau distillée,
 - 2 cm³ de réactif au 3,5-DNS.
- Boucher les tubes avec du papier alu. et les porter au bain-marie à 100°C pendant 5 min exactement,
- Refroidir dans un bain d'eau froide
- Ajouter 12 cm³ d'eau distillée
- Mesurer les absorbances à 530 nm contre un blanc.

Manipulations à effectuer :

- Préparation par pesée de 100cm³ de solution étalon de, sucres réducteurs à 1g de glucose par dm³ et 1g de fructose par dm³.
- Gamme d'étalonnage de 6 tubes contenant de 0 à 2mg de sucres réducteurs par tube, à préparer à partir de la solution étalon de glucose et fructose (volumes v à déterminer).
- Dosage sur le Jus de raisin décoloré, noté solution S (2 essais) :
 - diluer au 1/100 le jus de raisin décoloré,
 - opérer sur $v = 1$ cm³.

1.2. Compte rendu

- Justifier et rassembler dans un tableau les indications relatives à la préparation des tubes de gamme et des essais.
- Tracer la courbe d'étalonnage; indiquer tes valeurs expérimentales retenues pour la détermination de la droite de régression (dans le cas de ce dosage, la droite ne passe pas systématiquement par l'origine); donner les paramètres de la droite de régression.
- Déterminer la concentration massique en sucres réducteurs dans le jus de raisin testé. La précision de ce dosage est estimée à 5 %.

2. DETERMINATION DE L'ACIDITÉ TOTALE PAR METHODE PHMETRIQUE (22 points).

La méthode de référence pour la détermination de l'acidité totale d'un vin consiste en un dosage potentiométrique: par convention, on amène le pH du vin à 7,0, la titration étant suivie au pH-mètre.

L'acidité due au dioxyde de carbone et au dioxyde de soufre n'est pas comprise dans la définition de l'acidité totale ; il faut donc préalablement éliminer ces deux composés.

Dans ce cas présent, il s'agit de déterminer l'acidité du jus extrait des grains de raisin prélevés; il n'y a aucune présence de dioxyde de soufre, ce composé étant incorporé au Jus après la vendange dans le but de ralentir le développement des bactéries lactiques tant que la fermentation alcoolique par les levures n'est pas terminée, et afin d'éviter que la fermentation malolactique ne démarre trop tôt. Le vin contient donc du dioxyde de soufre alors que le jus de raisin initial n'en contient pas.

Il suffira donc d'éliminer le dioxyde de carbone par agitation du jus sous pression réduite à température ordinaire.

2.1. Élimination du dioxyde de carbone du jus de raisin

- La dépression est obtenue grâce à une trompe à eau, agiter environ 2min, jusqu'à ce que le jus ne mousse plus.

2.2. Dosage potentiométrique

- Lire la notice du pH-mètre et le mettre sous tension.
- Étalonner le pH-mètre selon les indications de la notice.
- Établir la courbe de titration de 20cm³ de jus de raisin par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration exacte 0,150mol.dm⁻³ jusqu'à obtention d'un pH égal à 7,0.

Remarque : Effectuer un essai préliminaire rapide avant mise en œuvre d'un dosage précis.

2.3. Compte rendu

- Donner la valeur obtenue lors de l'essai préliminaire rapide. Justifier les volumes choisis pour l'obtention de la courbe de titration.
- Donner le tableau des mesures obtenues et tracer la courbe de titration
- Déterminer l'acidité totale exprimée en concentration molaire en protons dans le jus de raisin.
- Exprimer le résultat de la façon conventionnelle en g d'acide sulfurique par dm³ de jus de raisin.

BILAN DES DEUX DOSAGES EFFECTUES :

Déterminer le rapport S/A du jus de raisin testé à partir des résultats exprimés chacun en g.dm⁻³.

Donnée: masse molaire H₂SO₄ = 98g.mol⁻¹

3. DOSAGE DU GLYCEROL PAR METHODE ENZYMATIQUE EN U.V. (22 points).

Le principe de la détermination enzymatique du glycérol est donné en annexe A. Le dosage sera effectué sur un vin blanc (2 essais).

3.1. Expliquer la préparation de ta solution échantillon dans le cas du dosage du vin blanc.

3.2. Faire le dosage.

3.3. Compléter le relevé de valeurs expérimentales.

3.4. Calculer la concentration molaire puis massique en glycérol dans le vin testé. La précision du dosage est évaluée à 2,5 %.

Annexe A: Mode d'emploi du pH-mètre

Mettre l'appareil sous tension.

1. Étalonnage

Rincer l'électrode et la sonde de température avec de l'eau distillée.

Plonger l'électrode et la sonde de température d'environ 4cm dans la solution tampon « pH 7,01 ».

Appuyer sur le bouton « cal ». Si le pHmètre ne sélectionne pas automatiquement la valeur du tampon, la rechercher à l'aide des touches « °C ».

Le symbole « not ready » clignotera sur l'afficheur jusqu'à stabilisation de la lecture. Lorsque « ready » s'affiche, valider la valeur en appuyant sur la touche « cfm ».

La valeur du tampon s'affiche sur l'afficheur primaire. Appuyer sur « cal » pour retour en mode normal de fonctionnement.

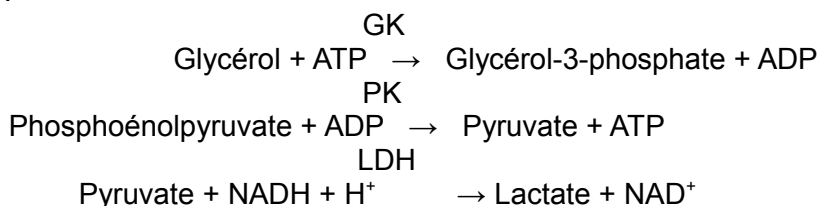
2. Mesure du pH

Rincer l'électrode et la sonde de température avec de l'eau distillée.

Plonger l'électrode dans la solution à mesurer. Procéder à la lecture de la valeur de cette solution après stabilisation.

ANNEXE B : DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLYCEROL (d'après Boehringer)

Principe :



Le glycérol est phosphorylé à partir d'ATP en présence de l'enzyme glycérol-kinase (GK). L'ADP formé réagit ensuite avec le phosphoénoipyrivate en présence de l'enzyme pyruvate-kinase (PK). Le pyruvate est alors réduit par NADH lors d'une troisième réaction catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH). C'est le NADH présent qui est mesuré spectrophotométriquement.

Préparation des échantillons.

Les boissons comme le vin et les jus de fruits peuvent être analysées directement après une dilution adéquate.

La concentration du glycérol dans l'échantillon doit se situer entre 0,03 g/L et 0,5 g/L.

Valeurs de mesure types.

Vin de table: 7,3g/L

Vin blanc: 8,2g/L

Vin rouge: 5,7g/L

Mode opératoire.

Opérer directement dans des cuves de 1 cm de trajet optique.

Introduire dans les cuves	blanc	échantillon
mélange de réactifs (solution 1)	1,00mL	1,00mL
eau bidistillée	2,00mL	1,90mL
solution échantillon	-----	0,10mL
PK et LDH (suspension 2)	0,01mL	0,01 mL
Mélanger. Après environ 5 à 7 min, lire les absorbances des solutions (A ₁).		
GK (suspension 3)	0,01mL	0,01mL
Mélanger. Attendre environ 10 min et lire les absorbances des solutions (A ₂). Contrôler la fin de la réaction par une 2ème lecture de A ₂ .		

Remarque : la mesure s'effectue contre l'air ou l'eau bidistillée.

Conditions de mesure et valeurs de calcul.

Longueur d'onde: 340nm

Trajet optique: 1cm

Température: 20 - 25°C

Volume du test: 3,02mL

Volume d'échantillon: 0,10mL

Masse molaire: 92,10g/mol pour le glycérol

ϵ : $6,3 \cdot 10^3 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour NADH à 340nm

Facteur de dilution: f

Variation d'absorbance corrigée: $\Delta A = \Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}$

LISTE DU MATERIEL

Partie 1 et 2

Matériel et produits :

Jus de raisin blanc « Récré de Auchan » : flacon de 60 mL

Soude titrée à 0,150 mol/L (flacon de 70 mL)

solution S : flacon de 10 mL.

Cuves spectro plastique 3 mL et portoir (1 boîte neuve répartie pour le groupe)

Pipettes auto avec embouts : P1000

P.J. de 1 mL

P.J. de 20 mL

P.G. de 1 mL et 5 mL

2 fioles jaugées de 100 mL

2 capsules de pesée

1 bêcher poubelles

1 bêcher de 100 mL forme haute

10 tubes à essais avec portoirs

Vortex 1 pour 2 postes

1 poste de pH-métrie pour 2 (pH-mètre, électrode, agitateur et petits barreaux)

Bechers de 50 mL pour solutions tampons (2 par poste de pHmétrie)

Solution tampon étalon pH 7 et pH 4

1 burette de 25 mL graduée au 1/20 (avec petit entonnoir) pour 2

Parafilm, papier Joseph, papier filtre, papier aluminium pour boucher les tubes

Trompe à eau, fiole de garde (fiole à vide) pour dégazage (4 dans le labo)

Glucose et fructose pour pesée (flacons communs en salle des balances)

Sur paillasse latérales :

Réactif au 3-5 DNS en flacon distributeur réglé sur 2 mL

2 flacons distributeurs réglés sur 12 mL contenant de l'eau déminéralisée

2 gros bains-marié 100°C

Étude du sujet

Partie 1

1.1. Calculer les masses de glucose et de fructose à peser.

Justifier et rassembler dans un tableau les indications relatives à la préparation des tubes de gamme et des essais.

1.2. Exemple de résultats :

Tube	1	2	3	4	5	6	E1	E2
Absorbance	0	0,124	0,290	0,466	0,654	0,820	0,545	0,559

Déterminer la concentration massique en sucres réducteurs dans le jus de raisin testé.

Réaliser la partie 1.

Partie 2

L'essai préliminaire rapide donne une chute de burette voisine de 12 mL : quelles seront les chutes de burette choisies, pour le dosage précis? Tracer semi-qualitativement l'aspect de la courbe pour une chute de burette de 12,15 mL.

Déterminer l'acidité totale exprimée en concentration molaire en protons dans le jus de raisin. Exprimer le résultat de la façon conventionnelle en « g d'acide sulfurique par dm de jus de raisin. »

Réaliser la partie 2.

Partie 3

3.1. Expliquer la préparation de la solution échantillon dans le cas du dosage du vin blanc.

	Blanc	E1	E2
A1	1,548	1,566	1,557
A2	1,512	0,934	0,931

3.4. Établir la formule littérale permettant de relier les absorbances à la concentration molaire puis à la concentration massique en glycérol dans le vin testé. Calculer ces concentrations.

Ne pas réaliser la partie 3