



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

CENTRE de FORMATION et de RECHERCHE  
en ŒNOLOGIE

DIPLOME NATIONAL D'ŒNOLOGUE

2021 - 2023

TRAVAUX PRATIQUES



## Table des matières

CHARTRE DE BONNE CONDUITE DE L'ETUDIANT EN SALLE DE TRAVAUX PRATIQUES (TP) DE CHIMIE .....	8
AVANT -PROPOS .....	10
SECTION 1 REVISIONS .....	11
1.1 Présentation de la verrerie de laboratoire .....	11
1.2 Dilutions .....	14
1.3 Acidimétrie.....	15
1.3.1 Etalonnage d'une solution préparée de NaOH .....	15
1.3.2 Titration acidimétrique acide fort – base forte .....	16
1.3.3 Titration acidimétrique acide faible – base forte.....	17
1.4 Oxydoréduction .....	18
1.4.1 Etalonnage d'une solution préparée d'iode .....	18
1.4.2 Détermination de la concentration en dioxyde de soufre .....	19
1.4.3 Détermination de la concentration en dioxyde de soufre par méthode spectrophotométrique .....	19
SECTION 2 ANALYSE DES MOUTS.....	22
2.1 Masse volumique : aréométrie .....	22
2.1.1 Principe.....	22
2.1.2 Traitement préalable.....	22
2.1.3 Précision de la mesure.....	22
2.1.4 Description des aréomètres .....	22
2.1.5 Protocole.....	23
2.1.6 Corrections nécessaires pour des antiseptiques.....	24
2.1.7 Calcul de la masse volumique à partir de la densité relative .....	24
2.2 Sucres .....	34
2.2.1 Richesse en sucres : méthode par réfractométrie .....	34
2.2.2 Dosage des sucres réducteurs .....	42
2.3 PH – acidités – acides organiques .....	48
2.3.1 Mesure du pH (méthode potentiométrique – méthode officielle type I).....	48
2.3.2 Acidité totale (titrage potentiométrique et avec indicateur).....	49
2.3.3 Dosage de l'acide tartrique méthode rapide colorimétrique .....	50
2.4 Dosage de l'azote assimilable .....	52
2.4.1 Détermination de la teneur en $\alpha$ -aminoacides par méthode NOPA.....	52
2.4.2 Détermination de l'azote ammoniacal par méthode enzymatique .....	53
SECTION 3 ANALYSE DES VINS BLANCS.....	61
3.1 Acides et acidité .....	61

3.1.1 Acidité totale (titrage potentiométrique et avec indicateur).....	61
3.1.2 Acidité volatile par entraînement et rectification des vapeurs .....	62
3.1.3 Dosage d'acide malique par méthode enzymatique.....	64
3.1.4 Mise en évidence de la fermentation malolactique .....	66
3.2 Titre alcoométrique volumique (TAV) .....	68
3.2.1 Préparation du distillat .....	68
3.2.2 Mesure du TAV du distillat.....	69
3.2.3 Ébulliométrie (méthode non-officielle).....	79
3.3 Matières minérales .....	80
3.3.1 Dosage du fer : méthode spectrophotométrique.....	80
3.3.2 Dosage du cuivre : méthode spectrophotométrique .....	81
3.4 Dioxyde de soufre .....	82
3.4.1 Dosage indirecte par la méthode Franz Paul.....	83
3.4.2 Dosage direct par la méthode rapide de Ripper (Type IV).....	86
3.4.3 Dosage direct par méthode potentiométrique.....	87
3.4.4 Dosage du SO <sub>2</sub> total par méthode spectrophotométrique.....	89
3.5 Sucres Résiduels.....	91
SECTION 4 MICROBIOLOGIE .....	93
4.1 Introduction .....	93
4.2 Première séance.....	94
4.2.1 Isolement de germes à partir d'un échantillon poly-microbien (travail individuel).....	94
4.2.2- Numération directe / dénombrement de levures: travail en groupe (4 ou 5.....	94
4.2.3 Contrôle d'ambiance .....	94
4.2.4 Analyse d'un vin (N° : ):.....	94
4.3 Deuxième séance.....	95
4.3.1 à partir de la boîte d'isolement des bactéries : .....	95
4.3.2 Observation de levures à partir de bouillons de culture .....	95
4.3.3 Observation de moûts non fermentés :.....	95
4.4 Troisième séance .....	95
4.4.1 Lecture du dénombrement de levures .....	95
4.4.2 Première lecture Sniff Brett .....	95
4.4.3 Commentaire fiches techniques .....	95
4.4.4 Observation d'échantillons concentrés de moût, vin, vinaigre .....	95
4.5 Quatrième séance .....	96
4.5.1 Observation de bactéries lactiques .....	96
4.5.2 Observation de contaminants à partir des contrôles d'ambiance .....	96
4.5.3 Deuxième lecture Sniff Brett: interprétation.....	96
4.5.4 Observation de culots de centrifugation de moût, vin, vinaigre.....	96

4.6	Fiches techniques .....	96
4.6.1	Examen d'un frottis après fixation et coloration de Gram .....	96
4.6.2	Examen à l'état frais en présence d'un colorant vital .....	97
4.6.3	Dénombrement microbien.....	98
4.6.4	Procédés de stérilisation .....	100
4.6.5	Moyens d'obtention de l'anaérobiose .....	100
4.6.6	Etude du type respiratoire des bactéries.....	101
SECTION 5 ANALYSES SPECIFIQUES DES VINS ROUGES .....		103
5.1	Composés phénoliques .....	103
5.1.1	Indice de Polyphénols Totaux <b><i>IPT</i></b> (Absorbance à 280 nm) .....	103
5.1.2	Couleur et caractéristiques chromatiques.....	103
5.1.3	Indice de Folin Ciocalteu .....	104
5.1.4	Dosage des tanins totaux .....	105
5.1.5	Indice HCl.....	107
5.1.6	Indice de gélatine .....	107
5.1.7	Indice de dialyse.....	108
5.1.8	Dosage des anthocyanes.....	109
5.1.9	Dosage des anthocyanes libres, faiblement polymérisés & condensés.....	110
5.1.10	Indice d'ionisation des anthocyanes.....	112
5.2	Eléments minéraux .....	113
5.2.1	Dosage du potassium, sodium, fer & cuivre par absorption atomique (méthode type I) .....	113
5.2.2	Dosage des chlorures : méthode potentiométrique (méthode type I).....	118
5.2.3	Dosage des phosphates : méthode colorimétrique .....	121
5.2.4	Dosage des sulfates : méthode rapide d'essai .....	122
5.2.5	Dosage des sulfates : méthode de référence.....	123
5.2.6	Cendres et alcalinité des cendres.....	124
5.2.7	Acidité totale .....	126
SECTION 6 PEDOLOGIE.....		130
6.1	Préliminaires : Prélèvement et préparation des échantillons.....	130
6.1.1.	Prise d'échantillons .....	130
6.1.2	Préparation des échantillons pour l'analyse .....	130
6.2	PH d'un sol.....	131
6.2.1	Définition .....	131
6.2.2	Principe.....	132
6.2.3	Mode opératoire .....	132
6.3	Conductivité .....	133
6.3.1	Principe.....	133

6.3.2	Mode opératoire .....	133
6.3.3	Résultats .....	133
6.4	Recherche du calcaire.....	134
6.4.1	Mise en évidence des traces de calcaire .....	134
6.4.2	Dosage du calcaire total .....	134
6.4.3	Dosage du calcaire actif .....	142
6.5	Dosage du carbone organique .....	143
6.5.1	Définition .....	143
6.5.2	Principe.....	143
6.5.3	Mode opératoire .....	144
6.6	Dosage de l'azote total .....	145
6.6.1	Définition .....	145
6.6.2	Principe.....	145
6.6.3	Mode opératoire .....	146
6.7	Dosage du phosphore assimilable .....	147
6.7.1	Définition .....	147
6.7.2	Principe.....	147
6.7.3	Mode opératoire .....	147
6.8	Capacité d'échange cationique par l'acétate d'ammonium.....	149
6.8.1	Définition .....	149
6.8.2	Origine de la capacité d'échange .....	149
6.8.3	Principe.....	150
6.8.4	Mode opératoire .....	151
6.8.5	Calculs.....	151
6.9	Analyse granulométrique : texture des sols.....	152
6.9.1	Principe.....	152
6.9.2	Mode opératoire .....	152
SECTION 7	PRATIQUES ŒNOLOGIQUES I	Identification des troubles et essais de collage
	154	
7.1	Caractérisation d'un trouble ou d'un dépôt.....	154
7.1.2	Principe.....	154
7.1.2	Etude du dépôt.....	155
7.2	Essais de collage des vins.....	159
7.2.1	Définition – Principe .....	159
<b>ESSAIS DE COLLAGE DES VINS ROUGES</b>		<b>164</b>
SECTION 8	PRATIQUES ŒNOLOGIQUES II	
		170
Traitement des vins au ferrocyanure .....		170
8.1	Introduction .....	170

8.2 Séance 1.....	170
8.2.1 Dosage du fer initial .....	170
8.2.2 Préparation de la gamme préparatoire.....	171
8.3 Séance 2.....	171
8.3.1 Test préparatoire.....	171
8.3.2 Préparation de la gamme définitive.....	171
8.4 Séance 3 Test définitif et dosage du fer résiduel.....	172
8.4.1 Test définitif.....	172
8.4.2 Dosage du fer résiduel.....	172
SECTION 9  PRODUITS DERIVES DE LA VIGNE ET DU VIN.....	174
9.1 Analyse des eaux de vie .....	174
9.1.1 Titres alcoométriques des eaux-de-vie .....	174
9.1.2 Ajustement du distillat a 50 % vol. ....	183
9.1.3 Dosage de l'acidité et de l'extrait sec.....	185
9.1.4 Dosage des aldéhydes totaux.....	186
9.1.5 Dosage du furfural.....	187
9.1.6  Dosage des esters totaux .....	188
9.2 Produits œnologiques .....	189
9.2.1 Indice d'ester et d'acide de l'acide metatartrique .....	189
9.2.2 Pureté des tanins.....	191
9.3 Analyse des vinaigres.....	192
9.3.1 Dosage de l'alcool par chromométrie .....	192
9.3.2 Dosage des acidités totale, fixe et volatile .....	194
SECTION 10  BIOTECHNOLOGIE .....	196
10.1 Introduction–Programme .....	196
10.2 Protocoles.....	197
10.2.1 Dosage de l'histamine par kit ELISA .....	197
10.2.2 Extraction et purification d'ADN génomique végétal .....	198
10.2.3 Extraction et purification de l'ADN génomique de levures.....	199
10.2.4 Dosage spectrophotométrique de l'ADN purifié .....	199
10.2.5 Amplification par PCR classique .....	200
10.2.5 (suite) Amplification par PCR classique.....	201
10.2.6 Amplification par PCR quantitative en temps réel : QRT-PCR.....	202
10.2.7 Electrophorèse en gel d'agarose.....	204



# CHARTRE DE BONNE CONDUITE DE L'ETUDIANT EN SALLE DE TRAVAUX PRATIQUES (TP) DE CHIMIE

Le travail en laboratoire de chimie requiert le montage d'appareillages complexes ou l'exécution d'opérations délicates ; il entraîne aussi la manipulation de produits qui peuvent être **toxiques, inflammables**. Les manipulations réalisées dans le cadre des TP de Chimie peuvent donc être à l'origine **d'accidents** ou **d'intoxications** graves dont les effets sont immédiats ou insidieux. **Toute personne** qui travaille dans une salle de TP doit connaître et appliquer rigoureusement les **règles de sécurité** et être au courant des **implications** et des **risques** associés à la manipulation en cours. Ainsi, toute personne présente dans une salle de **TP de Chimie** qui ne tient pas compte des règles de sécurité, **court un risque élevé** dont les **conséquences** pour **elle-même** et **ses collègues** peuvent être graves.

**Sa responsabilité est donc engagée.**

<p><b>1. L'accès</b> de la salle de Travaux Pratiques est strictement limité aux <b>étudiants inscrits</b> à la séance de Travaux Pratiques en cours.</p> <p><b>2. Lors de chaque séance de TP l'étudiant(e) doit :</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Porter obligatoirement une <b>blouse</b> en coton.</li><li>• Porter obligatoirement des <b>lunettes de protection</b> (obligatoire aussi pour les porteurs de lentilles et les porteurs de lunettes).</li><li>• <b>Attacher ses cheveux</b> s'ils sont longs.</li><li>• Ne pas <b>fumer</b>, ni <b>manger</b>, ni <b>boire</b>.</li><li>• Ne pas courir ni lancer d'objets dans la salle.</li><li>• Utiliser les portemanteaux mis à disposition</li></ul> <p><b>3. Lors de la réalisation de toutes manipulations, l'étudiant(e) doit :</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Signaler tout <b>défaut de verrerie</b> ou de matériel à <b>l'enseignant</b>.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Maintenir les <b>paillasse propres et dégagées</b>.</li><li>• Eviter de déposer verreries et flacons en <b>bordure de paillasse</b>.</li><li>• <b>Lire</b> les étiquettes des flacons des produits utilisés.</li><li>• <b>Identifier</b> toute <b>solution préparée</b> en cours de séance.</li><li>• Ne jamais <b>pipeter</b> une solution à la <b>bouche</b>, utiliser une propipette.</li><li>• <b>Respecter</b> les <b>consignes de manipulation</b> des produits chimiques (particulièrement pour ceux nécessitant l'utilisation d'une hotte aspirante).</li><li>• <b>Eviter les projections</b> (faire attention à l'orientation des tubes à essai et autre verrerie, utiliser de petites quantités).</li><li>• <b>Respecter les consignes</b> données par <b>l'enseignant</b> pour l'élimination des déchets.</li></ul>
--	--

Je soussigné ..... (NOM, Prénom)

Atteste avoir pris connaissance de « La charte de bonne conduite de l'étudiant en salle de TP de chimie. « **LU et APPROUVE** » « ..... ».

Montpellier le ..... (Date)

SIGNATURE.....



## AVANT -PROPOS

Il est nécessaire de venir à la séance de travaux pratiques (TP) en ayant **pris connaissance du contenu de la séance**, préparé les éventuels calculs et en s'étant renseigné sur la thématique en lien avec l'œnologie (*a minima* avoir relu les cours magistraux).

L'étudiant admis à présenter le Diplôme National d'Œnologue se doit de maîtriser différentes notions de physique et chimie élémentaires. Dans le cas contraire, il doit aller se documenter dans des ouvrages de références, disponibles à la bibliothèque universitaire par exemple.

### En particulier il doit :

- Connaître le principe de la **loi d'Archimède**, de la **distillation** et de l'**entraînement** à la vapeur
- Connaître les notions **d'oxydoréduction**, de réaction **acido-basique**.
- Connaître la chimie de l'iode et du manganèse (couples rédox...)
- Connaître les **masse molaires** des principaux atomes (C, H, N, S, O, Na...) ou bien se munir d'une table
- Savoir exprimer un **titre de solution** (molarité, concentration massique, titre volumique)
- Savoir **calculer ce titre** au terme d'un dosage acido-basique ou d'oxydoréduction
- Connaître les zones de virage et les couleurs des principaux **indicateurs colorés** (Phénolphthaléine, Bleu de bromothymol, Vert de bromocrésol, Hélianthine, Empois d'amidon) ou bien se procurer une table.
- Connaître les noms et les domaines de précision de la **verrerie** de laboratoire et des autres objets ( fioles jaugées, pipettes, béchers, boîtes de Petri...)

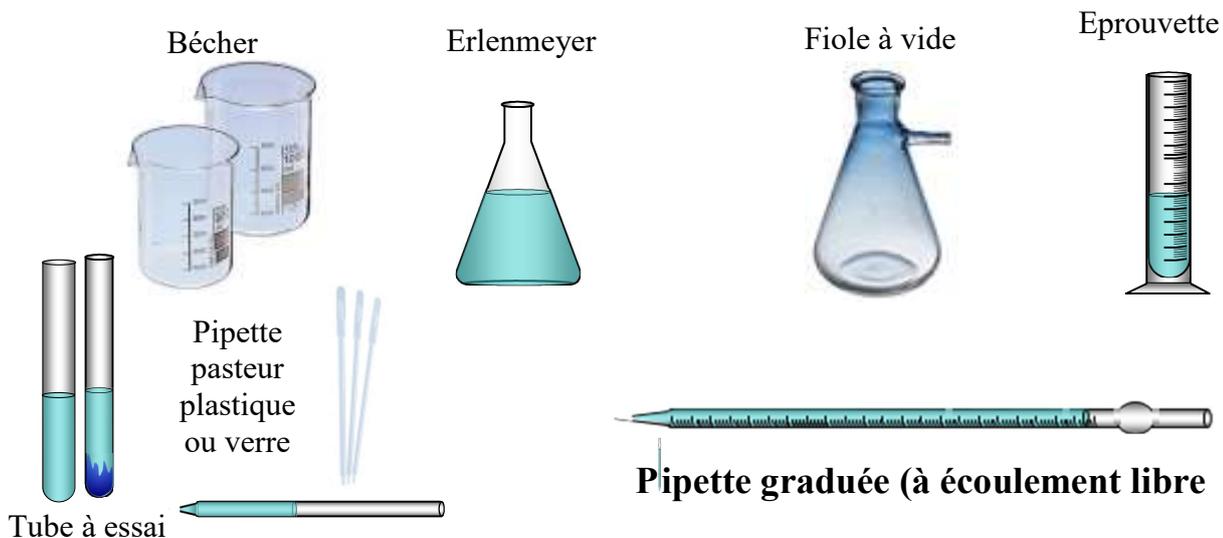
Il est vivement conseillé de visiter le site internet de l'O.I.V. ([www.oiv.int](http://www.oiv.int)), sur lequel on trouve, en accès libre, l'ensemble des méthodes d'analyses des moûts et des vins, ainsi que de nombreux autres documents (ex le codex œnologique et le code des pratiques œnologiques).

# PREMIERE ANNEE

## SECTION 1 REVISIONS

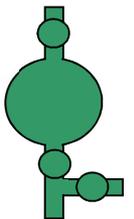
### 1.1 Présentation de la verrerie de laboratoire

Il faut bien faire la distinction entre la verrerie courante, la verrerie graduée et la verrerie jaugée. La verrerie courante n'est pas précise ; elle est utilisée pour effectuer des manipulations qui ne nécessitent pas une connaissance précise des volumes. Elle permet des mesures très approximatives. Elle est utilisée comme récipient de réaction (erlenmeyers, béchers, ballons...).



La verrerie graduée est utilisée pour prélever des produits qui n'interviennent pas quantitativement dans la réaction chimique du dosage. Cette verrerie permet de mesurer de façon peu précise des volumes variant de 1 à 1000mL. Les pipettes à écoulement libre et les burettes sont des exemples de la verrerie graduée

On prélève les solutions à l'aide d'un PRO-PIPETTE



Consignes pour l'utilisation de la burette :

*Vérifier l'étanchéité du robinet.*

*Introduire environ 10 mL de la solution à utiliser pour le dosage et rincer toute la burette en amenant le liquide en contact avec toutes les parois.*

*Jeter le liquide.*

*Replacer la burette sur son support et la remplir de solution au-dessus de zéro.*

*Éliminer toutes les bulles d'air en particulier dans le capillaire sous le robinet.*

*Ajuster le bas du ménisque tangent au trait zéro*

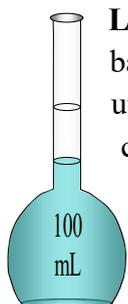
La verrerie jaugée destinée à délivrer un seul volume de façon très précise. L'incertitude relative de la mesure dépend de la classe du

Burette graduée



matériel : **Classe B** : tolérance inférieure à 0,5% du volume total. **Classe A** : tolérance inférieure à 0,2% du volume total.

La verrerie jaugée ne doit pas subir de traitement thermique (ni frigo, ni étuve).



**Les fioles jaugées** sont utilisées pour compléter à un volume donné ; le bas du ménisque arrive au niveau du trait de jauge. Une fiole jaugée est utilisée pour diluer une solution et pour préparer des solutions de titre connu par dilution à un volume connu d'une masse connue du soluté.

On complète au trait de jauge avec la solution dans laquelle le soluté est dissout.



Une fiole jaugée est étalonnée à 20°C ; il est donc indispensable de la laisser à cette température et de ne jamais la chauffer ou la refroidir. En effet, lorsqu'elle est chauffée, le verre se dilate et ne revient pas à sa position initiale. Le volume affiché serait donc, dans ce cas, entaché d'une incertitude supérieure à celle tolérée. Le contenu de la fiole de jauge peut servir de prise d'essai, et une fois le contenu versé, on la rince avec le liquide utilisé pour compléter au trait de jauge et on **récupère les solutions de rinçage**.

Les **pipettes volumétriques** sont utilisées pour prélever et délivrer un volume précis, par exemple la **prise d'essai** du liquide à doser. Il existe deux types de pipette volumétrique : à **deux traits** et où le volume à délivrer reste entre le trait supérieur et le trait inférieure, et une pipette à **un trait** où le volume à délivrer est entre le trait et le bout de la pipette. Les deux types de pipette sont utilisés dans les travaux pratiques du laboratoire d'œnologie.



Le prélèvement de la solution s'effectue après avoir préalablement rincé la verrerie utilisée avec la solution à prélever. Les pipettes doivent être maintenues verticales durant le prélèvement et l'écoulement de la solution. La pointe effilée doit toucher le récipient receveur avec un angle de 45°. On ne doit **pas** souffler dans la pipette pour faire couler la goutte restant dans la pointe. Contrairement aux fioles jaugées, on **ne récupère pas** le liquide restant dans la pipette une fois la solution versée.

Tableau d'erreurs de mesure dans l'emploi de la verrerie traditionnelle (classe B).

Pipette jaugée		Fiole jaugée		Burette graduée		Éprouvette	
V(mL)	ΔV(mL)	V(mL)	ΔV(mL)	V(mL)	ΔV(mL)	V(mL)	ΔV(mL)
10	0,03	100	0,1	25	0,05	100	2
20	0,04	200	0,2	50	0,1		
25	0,05					Bécher	
50	0,07					100	>5

## **Avant de commencer toute manipulation**

1. **Lire attentivement la totalité** du protocole
2. Notez la **disposition** (matériel, réactifs et verrerie etc.) de chaque poste (prendre une photo si nécessaire !).

**Vous êtes tenus de laisser le poste tel que vous l'avez trouvé. Il y aura des contrôles ponctuels.**

3. **Identifier la verrerie** à utiliser pour les différentes **étapes** de la manipulation (fiolle erlenmeyer ou bécher ; pipette volumique ou graduée ; à deux traits/un trait etc.)
4. Noter **où les réactifs sont placés** (à votre poste, au milieu de la paillasse, sur la paillasse du fond). Ramener-les à leur place que vous en avez terminé.
5. **Ne pas déplacer** de la verrerie ni des réactifs d'un poste à l'autre.
6. Bien **nettoyer** et rincer (avec l'eau distillée) la verrerie après utilisation.

## 1.2 Dilutions

### Faire une dilution à partir d'une solution mère de concentration connue

Matériel nécessaire : fioles jaugées de volumes adaptés, pipettes jaugées de volumes adaptés, pissette d'eau distillée, bécher, pro-pipette.

#### LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION FILLE EST CONNUE

Préparation d'une solution par dilution : on dispose d'une solution mère (**SM**) de concentration connue **C<sub>i</sub>**. On veut préparer un volume de solution fille **V<sub>f</sub>** à une concentration **C<sub>f</sub>**. Il faut donc calculer **V<sub>i</sub>**, le volume de la **SM** à prélever

D'après l'équation de conservation de la matière, le nombre de moles (**C<sub>i</sub>**) dans le volume (**V<sub>i</sub>**) de la **SM** prélevé **est égal** au nombre de moles (**V<sub>f</sub>**) dans le volume (**V<sub>f</sub>**) de la solution fille à préparer.

*Soit :*

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

*Donc V<sub>i</sub> (la grandeur à calculer) est :*

$$V_i = \frac{(C_f \times V_f)}{C_i}$$

#### LE FACTEUR DE DILUTION EST CONNU

A partir d'une solution mère de concentration **C<sub>i</sub>** connue, on veut réaliser une dilution au 10<sup>ième</sup> pour obtenir un volume précis (**V<sub>f</sub>**) d'une solution fille, de concentration connue (**C<sub>f</sub>**). Il faut donc calculer **V<sub>i</sub>**, le volume de la **SM** à prélever.

$$\begin{aligned} \text{Facteur de dilution } \mathbf{F} &= 10 \\ &= \mathbf{C_i/C_f} \\ &= \mathbf{V_f/ V_i} \\ \text{Donc } \mathbf{V_i} &= \mathbf{V_f/F} \end{aligned}$$

## 1.3 Acidimétrie

### Indicateurs acido-basiques :

Nom usuel de l'indicateur coloré	Couleur de la forme HA	Zone sensible, intervalle de pH	Couleur de la forme A <sup>-</sup>
Bleu de bromophénol	Jaune	3.00-4.60	Bleu
Hélianthine (orange de méthyle)	Rouge	3.10-4.40	Jaune
Rouge de méthyle	Rouge	4.20-6.20	Jaune
Bleu de bromothymol	Jaune	6.00-7.60	Bleu
Phénolphtaléine	Incolore	8.30-10.00	Rose

#### 1.3.1 Etalonnage d'une solution préparée de NaOH

Les méthodes en chimie analytique du vin, consistant à rechercher la quantité de matière d'une espèce chimique en solution peuvent être réalisées de plusieurs façons. Nous reverrons ici des méthodes **chimiques** ainsi qu'une méthode **physique** : dosage du SO<sub>2</sub> par spectrophotométrie.

Faire un dosage chimique par titration consiste à rechercher la quantité d'une espèce chimique en solution (réactif **titré**) en la faisant réagir totalement et rapidement avec une espèce chimique en solution de concentration connue (réactif **titrant**). Ces réactions sont utilisées pour, par exemple, étalonner une solution de base par un acide, ou vice-versa.

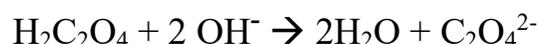
Les substances standards habituellement utilisées pour préparer des solutions acides étalons pour les titrages acide/base sont l'acide oxalique H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (HOOC-COOH, pK<sub>1</sub> = 1,23 & pK<sub>2</sub> = 4,19), l'acide borique H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ou le biphthalate de potassium (hydrogénophthalate de potassium, HOOC-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOK). Il n'est pas possible de préparer des solutions étalons d'acide chlorhydrique ou sulfurique par dilution directe de ces acides à l'état concentré. Il faudra donc les titrer à partir d'une solution standardisée d'hydroxyde de sodium.

Cependant, on ne peut pas préparer non plus une solution étalon de NaOH par simple pesée, en raison du caractère très hygroscopique de ce composé. Les solutions d'hydroxyde de sodium devront donc être standardisées par titrage avec une solution étalon d'acide mentionnées ci-dessus. En outre, la carbonatation importante des solutions de NaOH en présence de CO<sub>2</sub> atmosphérique nécessitera un réétalonnage fréquent de ces solutions.

L'acide oxalique H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> se présente sous la forme di-hydratée, H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (M = 126 g/mol).

#### **REACTION IMPLIQUEE**

La réaction entre l'acide oxalique et la NaOH s'écrit :



## PROTOCOLE

### Préparation de la solution d'acide oxalique

Quand on effectue un dosage, on utilise une prise d'essai de façon que la chute de burette à l'équivalence (c'est à dire au moment du virage de l'indicateur coloré) soit de 10 à 20 mL. Pour qu'il en soit ainsi, il sera nécessaire d'utiliser une solution d'acide oxalique à 0,05 M (0,1 N)

### Préparation de 100 mL d'acide oxalique à 0,1 N

Calcul de la masse d'acide oxalique à peser

*DONNEES :*

Masse molaire :  $M_{\text{acide}} =$  ..... g.mol<sup>-1</sup>

Volume de solution à préparer :  $V_{\text{acide}} = 200 \text{ mL} = 0,2 \text{ L}$

Concentration souhaitée :  $= 0,05 \text{ M (0,1 N)}$

D'où la masse nécessaire :  $m_{\text{acide}} =$  ..... g.

Peser précisément la masse d'acide oxalique calculée précédemment, le dissoudre dans un bêcher avec de l'eau distillée et transférer-le dans une fiole jaugée de 100 mL. Puis compléter au trait de jauge et homogénéiser.

## DOSAGE

- Prélever précisément  $V_A = 10 \text{ mL}$  de la solution d'acide oxalique ;
- Verser cette solution dans un erlenmeyer de 100 mL ;
- Ajouter 4 ou 5 gouttes de phénolphtaléine ;
- Remplir la burette avec la solution de NaOH à étalonner (*faire le zéro et vérifier qu'il n'y ait pas de bulle d'air au-dessous du robinet*) ;
- Verser lentement la NaOH jusqu'au virage au rose pâle de l'indicateur coloré ;
- Noter  $V_B =$  le volume de NaOH versé.

## CALCUL

On utilise la définition de l'équivalence : on se trouve à l'équivalence quand le nombre d'équivalents d'acide oxalique (dans ce cas) est égal au nombre d'équivalents de la NaOH (dans ce cas) dans le milieu réactionnel.

A l'équivalence donc

$$N_A \times V_A = N_B \times V_B$$

$V_A$  : volume d'acide prélevé ;

$N_A$  : concentration (N) de la solution oxalique ;

$V_B$  : volume de la NaOH versé à l'équivalence ;

$N_B$  : concentration de la NaOH préparée (à calculer).

Calculer la concentration de la NaOH en équivalents par litre et en g/L.

### 1.3.2 Titration acidimétrique acide fort – base forte

L'acide chlorhydrique, HCl, est, en fait un gaz dissout dans de l'eau en équilibre avec l'espace de tête (la vapeur) au-dessus du liquide. Chaque fois que l'on ouvre un flacon de l'acide chlorique, le HCl gaz va s'échapper et la solution deviendra progressivement plus diluée. Il

convient donc d'étalonner les solutions HCl avec une solution titrée de NaOH, dans ce cas, la solution de NaOH étalonée dans la manipulation précédente.

## PROTOCOLE

1. Verser 10 mL de la solution d'HCl fourni dans un erlenmeyer de 100 mL ;
2. Ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine ;
3. Remplir la burette avec la solution titrée de NaOH ;
4. Verser la solution la NaOH jusqu'au virage.
5. Noter le volume ( $V_B$ ) versé.

Comme précédemment :

$$N_A \times V_A = N_B \times V_B$$

$V_A$  : volume d'acide prélevé ;

$N_A$  : concentration de la solution HCl à calculer ;

$V_B$  : volume de NaOH versé à l'équivalence ;

$N_B$  concentration de NaOH étalonée.

Calculer la concentration d'HCl en équivalents par litre et en g par litre.

Tracer la courbe de titrage théorique pour ce dosage en indiquant le point d'équivalence et le pH du milieu au point d'équivalence.

### 1.3.3 Titration acidimétrique acide faible – base forte

## PROTOCOLE

Dans cette manipulation on détermine la concentration d'un acide faible (acide lactique) par titrage avec une base forte (solution NaOH étalonée en section 1.3.1).

1. Verser 10 mL de la solution d'acide lactique dans un erlenmeyer de 100 mL
2. Ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine.
3. Remplir la burette avec la solution étalonée de NaOH.
4. Verser la solution titrée de NaOH jusqu'au virage.
5. Noter le volume ( $V$ ) versé.

Comme précédemment :

$$N_A \times V_A = N_B \times V_B$$

$V_A$  : volume d'acide prélevé ;

$N_A$  : concentration (N) de la solution d'acide lactique à calculer

$V_B$  : volume NaOH versé à l'équivalence ;

$N_B$  : concentration de la NaOH préparée.

Calculer la concentration d'acide lactique en équivalents par litre et en g par litre.

## QUESTIONS

- Ecrire la formule d'acide lactique et la formule de sa base conjuguée.
- Ecrire l'équation de la réaction de l'acide lactique avec l'hydroxyde de sodium.
- Quel est l'indicateur le plus adapté ? Justifier votre réponse.

## 1.4 Oxydoréduction

### 1.4.1 Etalonnage d'une solution préparée d'iode

Des solutions d'iode (ou plus précisément de diiode,  $I_2$ ) en concentration faible sont couramment utilisées en œnologie pour le dosage du dioxyde de soufre dans le vin. La méthode dite « Ripper » est basée sur cette réaction. Or, les solutions d'iode sont instables et doivent être étalonnées régulièrement. Pour ce faire, on se base sur la réaction redox (oxydoréduction) entre l'iode et le thiosulfate de sodium

L'équation-bilan de la réaction redox de l'iode avec les ions thiosulfate  $S_2O_3^{2-}$  est :



Afin d'étalonner la solution d'iode fournie, on mesure le volume de solution d'iode à verser dans la solution de thiosulfate pour atteindre l'équivalence. Quand tout le thiosulfate a réagi avec l'iode la solution devient bleue (complexe formé avec l'amidon utilisé comme « indicateur »).

## PROTOCOLE

Prélever 10 mL ( $V_A$ ) de de la solution de thiosulfate ( $N_A$ ) de concentration connue.

1. Verser cette solution dans l'erenmeyer et ajouter quelques gouttes d'amidon.
2. Remplir la burette avec la solution d'iode à étalonner
3. Verser la solution jusqu'au virage.

Noter le volume d'iode versé ( $V_B$ ).

Comme précédemment :

$$N_A \times V_A = N_B \times V_B$$

$V_A$  : volume de la solution de thiosulfate prélevé ;

$N_A$  : concentration de la solution thiosulfate prélevé

$V_B$  : volume de d'iode versé à l'équivalence

$N_B$  : concentration de la solution d'iode à étalonner

Calculer la concentration de la solution d'iode en équivalents par litre et g par litre.

### 1.4.2 Détermination de la concentration en dioxyde de soufre

Comme précisé précédemment, le dioxyde de soufre, espèce oxydable, est souvent dosé par réaction redox avec l'iode. Puisque ces réactions consomment des ions  $H^+$ , un milieu contenant de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) ou de l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ) est donc nécessaire. D'ailleurs, dans le cas précis du dosage du  $SO_2$  par l'iode, l'acidification est également nécessaire car au-delà de pH 7, l'iode est converti en  $IO_3^-$  avant d'avoir pu réagir avec le  $SO_2$ .

#### PROTOCOLE

Prélevez 10 mL ( $V_A$ ) de la solution de dioxyde de soufre de concentration ( $N_A$ ) inconnue et y ajouter *environ* 1 mL d'empois d'amidon et 2 mL de la solution du  $H_2SO_4$  dilué au 1/3.

Remplir la burette avec la solution d'iode précédemment titrée ( $N_B$ ), et verser-la jusqu'à ce que la coloration bleutée persiste ( $V_B$ ).

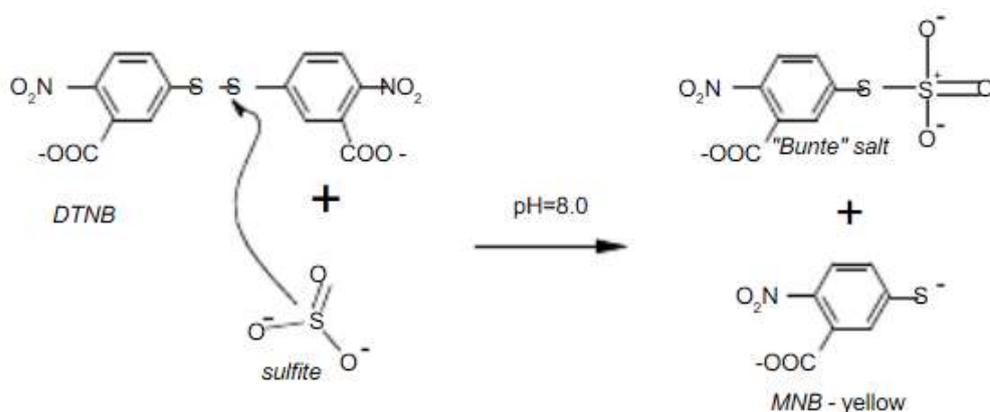
Calculer la concentration en dioxyde de soufre en équivalents par litre et en mg/L.

### 1.4.3 Détermination de la concentration en dioxyde de soufre par méthode spectrophotométrique

Ce dosage s'agit d'une méthode physique : on mesure l'absorbance (propriété physique) du  $SO_2$  en fonction de sa concentration. Pour ce faire on calcule la concentration du  $SO_2$  utilisant une gamme d'étalonnage (courbe de concentration) établie par la mesure d'absorbance d'une série de solutions de concentrations connues.

#### PRINCIPE

L'échantillon est dilué dans une solution tampon phosphate de pH 8. Après stabilisation, le milieu de réaction reçoit une solution tamponnée de DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (3,3'-6) ou 3-Carboxy-4-nitrophenyl disulfide, («réactif d'Ellman»). Il s'agit d'un réactif spécifique permettant la modification et la détection quantitative des liaisons disulfites dont la formule développée est donnée ci-dessous :



Le réactif 1 sert à ajuster le pH du milieu à 8, car la réaction n'aura lieu qu'un milieu alcalin.

## MODE OPERATOIRE

### Manipulation à faire en binôme

Réactifs (fournis)

#### - Réactif 1 tampon pH 8

$K_2HPO_4$  17,4 % m/v. Le pH de la solution tampon est ajusté par addition de  $H_3PO_4$  pour obtenir une valeur de 8 (écart maximum tolérable :  $\pm 0,2$  unité pH).

#### - Réactif 2

DNTB 760 mg

Réactif 1 900 ml

Ethanol pur 100 ml

{ **L'échantillon** est la solution  $SO_2$  dosée précédemment par l'iode diluée **100<sup>ième</sup>** }

Dans 8 tubes à hémolyse ajouter (en mL)

Concentration étalon	Etalons					Témoin	Dosage
	5	10	15	20	25		
$SO_2$ 50 mg/L	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0	0
Echantillon	0	0	0	0	0	0	1
$H_2O$	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	1	0
Réactif 1	1	1	1	1	1	1	1
	Attendre 5 minutes						
Réactif 2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

**Après 5 minutes**, lire l'absorbance à 440 nm des 5 étalons et la solution à doser utilisant le témoin comme blanc (= en faisant le « zéro » avec le témoin).

Faire une gamme d'étalonnage à partir des 5 valeurs d'absorbance des étalons en fonction de concentration (fichier Excel sur l'ordinateur au fond de la salle). Lire l'absorbance de l'échantillon et calculer la concentration en  $SO_2$  par interpolation de l'absorbance de l'échantillon sur la gamme d'étalonnage.

Donner la concentration en  $SO_2$  total en mg/L et en  $\mu g/l$ .

***NB : si l'absorbance de votre échantillon dépasse celle du point le plus haut de la gamme, refaire la manipulation en diluant votre échantillon en deux.***

Rentrer la concentration en  $SO_2$  trouvée par cette méthode ainsi que celle trouvée par titration dans la même table Excel. Les concentrations moyennes (entre les 10 binômes) trouvées par les deux méthodes seront comparées.



## SECTION 2 ANALYSE DES MOÛTS

---

### 2.1 Masse volumique : aréométrie

#### 2.1.1 Principe

La masse volumique et la densité relative du vin et du moût sont déterminés à 20 °C.

La **masse volumique** est le quotient de la masse d'un certain volume de vin ou de moût à 20 °C par ce volume. Elle s'exprime en g/cm<sup>3</sup> et son symbole est  $\rho_{20}$ .

La **densité relative** est le rapport de la masse volumique du vin (ou du moût) à 20 °C, à la masse volumique de l'eau à la même température. Ce rapport est exprimé en nombre décimal. Son symbole est  $d_{20}$  ou simplement  $d$ , lorsqu'il n'y a pas de confusion possible.

Par convention, la masse volumique et la densité doivent être corrigées de l'action de l'anhydride sulfureux et/ou du salicylate de sodium ajouté au moment du prélèvement pour stabiliser le vin ou le moût prélevé.

#### 2.1.2 Traitement préalable

Si le vin ou le moût contient des quantités notables de gaz carbonique, en chasser la plus grande quantité par agitation de 250 mL de vin dans un flacon de 1000 mL ou par filtration sous pression réduite sur 2 g de coton hydrophile placé dans une allonge.

Si le vin ou le moût est trouble, filtrer 250 mL de vin ou de moût sur papier à filtration rapide, à plis, en entonnoir couvert ou les centrifuger en tubes fermés ; on recueillera le filtrat dans un flacon de 250 mL. La mention de cette opération sera portée sur le bulletin d'analyse.

Les sucres dont la densité est de 1,6 environ, augmentent la densité des solutions dans lesquelles ils sont impliqués proportionnellement à leur concentration.

#### 2.1.3 Précision de la mesure

Les résultats sont approchés à 0,0003 près.

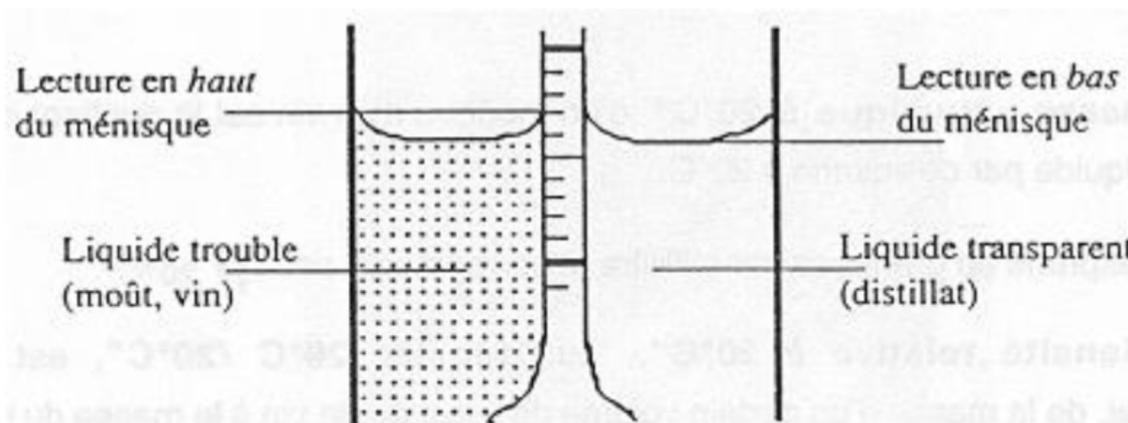
#### 2.1.4 Description des aréomètres

On constate en physique qu'un corps flottant émerge d'autant plus du liquide dans lequel il est plongé que celui-ci est dense que la masse volumique d'une solution augmente quand on accroît la masse de soluté. Ce sont sur ces principes de physiques que fonctionnent les aréomètres. Les appareils devront répondre aux prescriptions de l'I.S.O. et de l'AFNOR en ce qui concerne leurs dimensions et leur graduation.

Ils doivent avoir une carène cylindrique, une tige de section circulaire, de 3 mm de diamètre au moins. Pour les vins secs, ils doivent être gradués de 0,960 à 1,005 par millièmes et cinquièmes de millième. Chaque millième doit être séparé par 5 mm au moins du millième suivant. Pour la

mesure de la densité des vins désalcoolisés, des vins doux et des moûts, il sera fait usage d'un jeu de 5 aréomètres gradués de : 1,000 – 1,030 ; 1,030 – 1,060 ; 1,060 – 1,090 ; 1,090 – 1,120 ; 1,120 – 1,150. Ces appareils seront gradués en masses volumiques à 20 °C par millièmes et demi-millièmes au moins, chaque millième étant séparé par 3 millimètres au moins du millième suivant.

Ces aréomètres doivent être gradués de manière à être lus au "sommet du ménisque".



Pour éviter toute confusion avec les aréomètres gradués à 15 °C et devant être lus au niveau de la surface liquide plane, l'indication de la graduation en masse volumique à 20°C et de la lecture au "sommet du ménisque" sera portée, soit sur l'échelle graduée, soit une bande de papier incluse dans la carène.

Le résultat sera exprimé avec 4 décimales à  $\pm 3$  unités près du quatrième ordre décimal.

On doit utiliser un thermomètre contrôlé gradué par  $\frac{1}{2}$  degré au moins.

Comme réaliser la mesure, on utilise une éprouvette cylindrique tenue verticalement grâce à un support à vis calantes.

Comment choisir l'aréomètre ?

### **2.1.5 Protocole**

1. Filtrer 250 mL de moût sur papier
2. Affranchir l'éprouvette avec le filtrat du moût ou avec le vin
3. Vérifier que l'aréomètre et le thermomètre sont propres
4. Remplir l'éprouvette du liquide à analyser au 2/3.
5. Plonger le thermomètre et l'aréomètre dans l'éprouvette
6. Rajouter du liquide pour en avoir le maximum dans l'éprouvette
7. Attendre quelques minutes
8. Faire deux ou trois lectures du thermomètre et noter la température  $t$  (°C)
9. Retirer le thermomètre
10. Régler le support de l'éprouvette pour que l'aréomètre ne touche pas les parois
11. Faire la lecture au sommet du ménisque de masse volumique,  $\rho_t$ .

La masse volumique à 20 °C est ensuite corrigée de l'action de la température à l'aide de la table 1.

La masse volumique est ensuite **corrigée** de l'action de dioxyde de soufre et du salicylate de sodium, comme dans le cas de la méthode de référence. A partir de la masse volumique trouvée, donner les teneurs en sucres correspondantes.

### **2.1.6 Corrections nécessaires pour des antiseptiques**

La masse volumique ou la densité doivent ensuite être corrigées de l'action de l'anhydride sulfureux et du salicylate de sodium ajouté par l'agent de prélèvement pour stabiliser l'échantillon en utilisant la formule :

$$\rho_{20} = \rho'_{20} - (0,0006 \times S) - (0,00043 \times ss)$$

avec : **S**, la quantité de SO<sub>2</sub> total en g/L

**ss**, la quantité de salicylate de sodium ajouté au vin en g/L

Si le vin a été stabilisé par addition d'acide salicylique, le coefficient 0,00043 devient 0,00031 et la formule est :

$$\rho_{20} = \rho'_{20} - (0,0006 \times S) - (0,00031 \times as)$$

**as** étant la quantité d'acide salicylique ajoutée en g/L.

### **2.1.7 Calcul de la masse volumique à partir de la densité relative**

$$\rho_{20} = 0,99820 \times d_{20} \quad \text{et} \quad d_{20} = 1,00180 \times \rho_{20}$$

## **EXEMPLE DE CALCULS**

### ***Polycopié TP : tables de correction***

	<b>Verre ordinaire (Aréomètre)</b>	<b>Pyrex (pycnomètre)</b>
Moûts et MCR	Table 1	Table 4
Vins secs	Table 2	Table 5
Vins de Liqueur	Table 3	Table 6

$$\begin{aligned} \rho_t &= 1,0660 \text{ g/mL} \\ t &= 21,3 \text{ °C} \end{aligned}$$

$\rho$ g/mL	1,06	1,07
21 °C	0,29	0,31
$\Delta$	0,29	0,30
22 °C	0,58	0,61

$$\begin{aligned} \Delta 1^\circ\text{C} &= \\ 0,58 - 0,29 &= \\ 0,29 & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta 1^\circ\text{C} &= \\ 0,61 - 0,31 &= \\ 0,30 & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta 0,3^\circ\text{C} &= \\ 0,087 & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta 0,3^\circ\text{C} &= \\ 0,090 & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} c(21,3^\circ\text{C}) & 0,29 + 0,087 = \\ & \underline{\mathbf{0,377}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & 0,31 + 0,09 = \\ & 0,400 \end{aligned}$$

On ajoute car quand la T°C augmente, la correction augmente aussi, puisque T°C est > 20°C.

$$\begin{aligned} \Delta \rho 0,01 \text{ à } 21,3^\circ\text{C} & = 0,4 - 0,377 = 0,023 \\ \Delta \rho (1,066 - 1,06) & = \frac{0,023 \times 0,006}{0,01} \\ & = \mathbf{0,0138} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} C 21,3^\circ\text{C} / \rho = 1,066 & = \mathbf{0,377} + 0,0138 \\ & = \mathbf{0,3908} \end{aligned}$$

On ajoute car quand  $\rho$  augmente, la correction augmente aussi :

$$\begin{aligned} \rho_{20} & = \rho_t + 0,3908/1000 \\ & = 1,066 + 0,0003908 = 1,06639 \\ & = \mathbf{1,0664 \text{ g/mL}} \text{ [4 chiffres]} \end{aligned}$$

**Table 1**

**Corrections « c » de température sur la masse volumique des MOUTS mesurée à t °C à l'aide d'un pycnomètre ou d'un aréomètre en VERRE ORDINAIRE, à t °C pour la ramener à 20 °C,**

$$\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000. \quad (-) \text{ si } t \text{ °C est inférieure à } 20 \text{ °C et } (+) \text{ si } t \text{ °C est supérieure à } 20 \text{ °C}$$

		Masses volumiques																						
		1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15	1,16	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26	1,28	1,30	1,32	1,34	1,36	
Température en °C	10	2,17	2,34	2,52	2,68	2,85	2,99	3,16	3,29	3,44	3,58	3,73	3,86	4,13	4,36	4,60	4,82	5,02	5,25	5,39	5,56	-5,73	5,87	
	11	2,00	2,16	2,29	2,44	2,59	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24	3,37	3,48	3,71	3,94	4,15	4,33	4,52	4,69	4,85	5,01	5,15	5,29	
	12	1,81	1,95	2,08	2,21	2,34	2,47	2,58	2,70	2,82	2,92	3,03	3,14	3,35	3,55	3,72	3,90	4,07	4,23	4,37	4,52	4,64	4,77	
	13	1,62	1,74	1,85	1,96	2,07	2,17	2,28	2,38	2,48	2,59	2,68	2,77	2,94	3,11	3,28	3,44	3,54	3,72	3,86	3,99	4,12	4,24	
	14	1,44	1,54	1,64	1,73	1,82	1,92	2,00	2,08	2,17	2,25	2,34	2,42	2,57	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24	3,35	3,46	3,57	3,65	
	15	1,21	1,29	1,37	1,45	1,53	1,60	1,68	1,75	1,82	1,89	1,97	2,03	2,16	2,28	2,40	2,51	2,61	2,71	2,80	2,89	2,94	3,01	
	16	1,00	1,06	1,12	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,54	1,60	1,65	1,75	1,84	1,94	2,02	2,09	2,17	2,23	2,30	2,36	2,42	
	17	0,76	0,82	0,86	0,91	0,96	1,00	1,05	1,09	1,14	1,18	1,22	1,25	1,32	1,39	1,46	1,52	1,57	1,63	1,67	1,71	1,75	1,79	
	18	0,53	0,56	0,59	0,63	0,65	0,69	0,72	0,74	0,77	0,80	0,82	0,85	0,90	0,95	0,99	1,02	1,05	1,09	1,13	1,16	1,18	1,20	
	19	0,28	0,30	0,31	0,33	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,42	0,43	0,43	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54	0,55	0,57	0,58	0,59	0,60	
	20																							
	21	0,28	0,29	0,31	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48	0,51	0,54	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60	0,60	
	22	0,55	0,58	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,78	0,81	0,84	0,87	0,93	0,97	1,02	1,06	1,09	1,12	1,15	1,17	1,19	1,19	
	23	0,85	0,90	0,95	0,99	1,04	1,08	1,12	1,16	1,21	1,25	1,29	1,32	1,39	1,46	1,52	1,58	1,62	1,68	1,72	1,75	1,77	1,79	
	24	1,15	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,48	1,54	1,60	1,65	1,71	1,76	1,86	1,95	2,04	2,11	2,17	2,23	2,29	2,33	2,35	2,37	
	25	1,44	1,52	1,59	1,67	1,74	1,81	1,88	1,95	2,02	2,09	2,16	2,22	2,34	2,45	2,55	2,64	2,74	2,81	7,87	2,90	2,92	2,96	
26	1,76	1,84	1,93	2,02	2,10	2,18	2,25	2,33	2,41	2,49	2,56	2,64	2,78	2,91	3,03	3,15	3,26	3,37	3,47	3,55	3,62	3,60		
27	2,07	2,16	2,26	2,36	2,46	2,56	2,65	2,74	2,83	2,91	3,00	3,07	3,24	3,39	3,55	3,69	3,82	3,94	4,04	4,14	4,23	4,30		
28	2,39	2,51	2,63	2,74	2,85	2,96	3,06	3,16	3,28	3,38	3,48	3,57	3,75	3,92	4,08	4,23	4,37	4,51	4,62	4,73	4,80	4,86		
29	2,74	2,86	2,97	3,09	3,22	3,34	3,46	3,57	3,69	3,90	3,90	4,00	4,20	4,39	4,58	4,74	4,90	5,05	5,19	5,31	5,40	5,48		
30	3,06	3,21	3,35	3,50	3,63	3,77	3,91	4,02	4,15	4,28	4,40	4,52	4,75	4,96	5,16	5,35	5,52	5,67	5,79	5,91	5,99	6,04		

**Table 2**

**Corrections « c » de température sur la masse volumique des VINS SECS et des vins secs débarrassés d'alcool mesurée à l'aide d'un pycnomètre ou d'un aréomètre en VERRE ORDINAIRE, à t °C, pour la ramener à 20 °C,**

$$\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000. (-) \text{ si } t \text{ °C est inférieure à } 20 \text{ °C et } (+) \text{ si } t \text{ °C est supérieure à } 20 \text{ °C}$$

		Titres alcoométriques																							
		0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Températures en °C	10	1,45	1,51	1,55	1,58	1,64	1,76	1,78	1,89	1,98	2,09	2,21	2,34	2,47	2,60	2,75	2,93	3,06	3,22	3,39	3,57	3,75	3,93	4,12	4,31
	11	1,35	1,40	1,43	1,47	1,52	1,58	1,65	1,73	1,83	1,93	2,03	2,15	2,26	2,38	2,51	2,65	2,78	2,93	3,08	3,24	3,40	3,57	3,73	3,90
	12	1,24	1,28	1,31	1,34	1,39	1,44	1,50	1,58	1,66	1,75	1,84	1,94	2,04	2,15	2,26	2,38	2,51	2,63	2,77	2,91	3,05	3,19	3,34	3,49
	13	1,12	1,16	1,18	1,21	1,25	1,30	1,35	1,42	1,49	1,56	1,64	1,73	1,82	1,91	2,01	2,11	2,22	2,33	2,45	2,57	2,69	2,81	2,95	3,07
	14	0,99	1,03	1,05	1,07	1,11	1,14	1,19	1,24	1,31	1,37	1,44	1,52	1,59	1,67	1,75	1,84	1,93	2,03	2,13	2,23	2,33	2,44	2,55	2,66
	15	0,86	0,89	0,90	0,92	0,95	0,98	1,02	1,07	1,12	1,17	1,23	1,29	1,35	1,42	1,49	1,56	1,63	1,71	1,80	1,88	1,96	2,05	2,14	2,23
	16	0,71	0,73	0,74	0,76	0,78	0,81	0,84	0,87	0,91	0,95	0,99	1,05	1,10	1,15	1,21	1,27	1,33	1,39	1,45	1,52	1,59	1,66	1,73	1,80
	17	0,55	0,57	0,57	0,59	0,60	0,62	0,65	0,67	0,70	0,74	0,77	0,81	0,84	0,88	0,92	0,96	1,01	1,05	1,10	1,15	1,20	1,26	1,31	1,36
	18	0,38	0,39	0,39	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,55	0,57	0,60	0,62	0,65	0,68	0,71	0,74	0,78	0,81	0,85	0,88	0,91
	19	0,19	0,20	0,20	0,21	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,34	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,44	0,46
	20																								
	21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,31	0,32	0,34	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48
	22	0,43	0,45	0,45	0,46	0,47	0,49	0,50	0,52	0,54	0,56	0,58	0,60	0,62	0,65	0,68	0,71	0,73	0,77	0,80	0,83	0,86	0,89	0,93	0,96
	23	0,67	0,69	0,70	0,71	0,72	0,74	0,77	0,79	0,82	0,85	0,88	0,91	0,95	0,99	1,03	1,07	1,12	1,16	1,21	1,25	1,30	1,35	1,40	1,45
	24	0,91	0,93	0,95	0,97	0,99	1,01	1,04	1,07	1,11	1,15	1,20	1,24	1,29	1,34	1,39	1,45	1,50	1,56	1,62	1,69	1,76	1,82	1,88	1,95
	25	1,16	1,19	1,21	1,23	1,26	1,29	1,33	1,37	1,42	1,47	1,52	1,57	1,63	1,70	1,76	1,83	1,90	1,97	2,05	2,13	2,21	2,29	2,37	2,45
	26	1,42	1,46	1,49	1,51	1,54	1,58	1,62	1,67	1,73	1,79	1,85	1,92	1,99	2,07	2,14	2,22	2,31	2,40	2,49	2,58	2,67	2,77	2,86	2,96
27	1,69	1,74	1,77	1,80	1,83	1,88	1,93	1,98	2,05	2,12	2,20	2,27	2,35	2,44	2,53	2,63	2,72	2,82	2,93	3,04	3,14	3,25	3,37	3,48	
28	1,97	2,03	2,06	2,09	2,14	2,19	2,24	2,31	2,38	2,46	2,55	2,63	2,73	2,83	2,93	3,03	3,14	3,26	3,38	3,50	3,62	3,75	3,85	4,00	
29	2,26	2,33	2,37	2,41	2,45	2,50	2,57	2,64	2,73	2,82	2,91	2,99	3,11	3,22	3,34	3,46	3,58	3,70	3,84	3,97	4,11	4,25	4,39	4,54	
30	2,56	2,64	2,67	2,72	2,77	2,83	2,90	2,98	3,08	3,18	3,28	3,38	3,50	3,62	3,75	3,88	4,02	4,16	4,30	4,46	4,61	4,76	4,92	5,07	

**Table 3**

**Corrections c de température sur la masse volumique des VINS DE LIQUEUR mesurée à t °C à l'aide d'un aréomètre ou d'un pycnomètre en VERRE ORDINAIRE à t °C pour la ramener à 20 °C,**

$$\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000. (-) \text{ si } t \text{ °C est inférieure à } 20 \text{ °C et } (+) \text{ si } t \text{ °C est supérieure à } 20 \text{ °C}$$

		Vins de 13% volume							Vins de 15% volume							Vins de 17% volume						
		Masses volumiques							Masses volumiques							Masses volumiques						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Température en °C	10	2,24	2,58	2,93	3,27	3,59	3,89	4,18	2,51	2,85	3,20	3,54	3,85	4,02	4,46	2,81	3,15	3,50	3,84	4,15	4,45	4,74
	11	2,06	2,37	2,69	2,97	3,26	3,53	3,78	2,31	2,61	2,93	3,21	3,51	3,64	4,02	2,57	2,89	3,20	3,49	3,77	4,03	4,28
	12	1,87	2,14	2,42	2,67	2,94	3,17	3,40	2,09	2,36	2,64	2,90	3,16	3,27	3,61	2,32	2,60	2,87	3,13	3,39	3,63	3,84
	13	1,69	1,93	2,14	2,37	2,59	2,80	3,00	1,88	2,12	2,34	2,56	2,78	2,88	3,19	2,09	2,33	2,55	2,77	2,98	3,19	3,39
	14	1,49	1,70	1,90	2,09	2,27	2,44	2,61	1,67	1,86	2,06	2,25	2,45	2,51	2,77	1,83	2,03	2,23	2,42	2,61	2,77	2,94
	15	1,25	1,42	1,59	1,75	1,90	2,05	2,19	1,39	1,56	1,72	1,88	2,03	2,11	2,32	1,54	1,71	1,87	2,03	2,18	2,32	2,47
	16	1,03	1,17	1,30	1,43	1,55	1,67	1,78	1,06	1,27	1,40	1,53	1,65	1,77	1,88	1,25	1,39	1,52	1,65	1,77	1,89	2,00
	17	0,80	0,90	1,00	1,09	1,17	1,27	1,36	0,87	0,98	1,08	1,17	1,26	1,35	1,44	0,96	1,06	1,16	1,26	1,35	1,44	1,52
	18	0,54	0,61	0,68	0,75	0,81	0,86	0,92	0,60	0,66	0,73	0,80	0,85	0,91	0,97	0,66	0,72	0,79	0,86	0,92	0,97	1,03
	19	0,29	0,33	0,36	0,39	0,42	0,45	0,48	0,32	0,36	0,39	0,42	0,45	0,48	0,51	0,35	0,38	0,41	0,45	0,48	0,51	0,53
	20																					
21	0,29	0,32	0,35	0,39	0,42	0,45	0,47	0,32	0,35	0,38	0,42	0,45	0,48	0,50	0,34	0,38	0,41	0,44	0,47	0,50	0,53	
22	0,57	0,64	0,70	0,76	0,82	0,88	0,93	0,63	0,69	0,75	0,81	0,87	0,93	0,99	0,68	0,75	0,81	0,87	0,93	0,99	1,04	
23	0,89	0,98	1,08	1,17	1,26	1,34	1,43	0,97	1,06	1,16	1,25	1,34	1,42	1,51	1,06	1,15	1,25	1,34	1,42	1,51	1,59	
24	1,22	1,34	1,44	1,56	1,68	1,79	1,90	1,32	1,44	1,54	1,66	1,78	1,89	2,00	1,43	1,56	1,65	1,77	1,89	2,00	2,11	
25	1,61	1,68	1,83	1,98	2,12	2,26	2,40	1,66	1,81	1,96	2,11	2,25	2,39	2,52	1,80	1,94	2,09	2,24	2,39	2,52	2,66	
26	1,87	2,05	2,22	2,40	2,56	2,71	2,87	2,02	2,20	2,37	2,54	2,70	2,85	3,01	2,18	2,36	2,53	2,71	2,86	3,02	3,17	
27	2,21	2,42	2,60	2,80	3,00	3,18	3,35	2,39	2,59	2,78	2,98	3,17	3,35	3,52	2,58	2,78	2,97	3,17	3,36	3,54	3,71	
28	2,56	2,80	3,02	3,25	3,47	3,67	3,89	2,75	2,89	3,22	3,44	3,66	3,96	4,07	2,97	3,21	3,44	3,66	3,88	4,09	4,30	
29	2,93	3,19	3,43	3,66	3,91	4,14	4,37	3,16	3,41	3,65	3,89	4,13	4,36	4,59	3,40	3,66	3,89	4,13	4,38	4,61	4,82	
30	3,31	3,57	3,86	4,15	4,41	4,66	4,92	3,55	3,81	4,10	4,38	4,66	4,90	5,16	3,82	4,08	4,37	4,65	4,93	5,17	5,42	

**Table 3 (suite)**

**Corrections c de température sur la masse volumique des VINS DE LIQUEUR mesurée à t °C à l'aide d'un aréomètre ou d'un pycnomètre en VERRE ORDINAIRE, à t °C pour la ramener à 20 °C,**

$$\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000. (-) \text{ si } t \text{ °C est inférieure à } 20 \text{ °C et } (+) \text{ si } t \text{ °C est supérieure à } 20 \text{ °C}$$

		Vins de 19% volume							Vins de 21% volume						
		Masses volumiques							Masses volumiques						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Températures en °C	10	3,14	3,48	3,83	4,17	4,48	4,78	5,07	3,50	3,84	4,19	4,52	4,83	5,12	5,41
	11	2,87	3,18	3,49	3,78	4,06	4,32	4,57	3,18	3,49	3,80	4,09	4,34	4,63	4,88
	12	2,58	2,96	3,13	3,39	3,65	3,88	4,10	2,86	3,13	3,41	3,67	3,92	4,15	4,37
	13	2,31	2,55	2,77	2,99	3,20	3,41	3,61	2,56	2,79	3,01	3,23	3,44	3,65	3,85
	14	2,03	2,23	2,43	2,61	2,80	2,96	3,13	2,23	2,43	2,63	2,81	3,00	3,16	3,33
	15	1,69	1,86	2,02	2,18	2,33	2,48	2,62	1,86	2,03	2,19	2,35	2,50	2,65	2,80
	16	1,38	1,52	1,65	1,78	1,90	2,02	2,13	1,51	1,65	1,78	1,91	2,03	2,15	2,26
	17	1,06	1,16	1,26	1,35	1,44	1,53	1,62	1,15	1,25	1,35	1,45	1,54	1,63	1,71
	18	0,73	0,79	0,85	0,92	0,98	1,03	1,09	0,79	0,85	0,92	0,98	1,05	1,10	1,15
	19	0,38	0,41	0,44	0,48	0,51	0,52	0,56	0,41	0,44	0,47	0,51	0,54	0,57	0,59
	20														
	21	0,37	0,41	0,44	0,47	0,50	0,53	0,56	0,41	0,44	0,47	0,51	0,54	0,57	0,59
	22	0,75	0,81	0,87	0,93	0,99	1,04	1,10	0,81	0,88	0,94	1,00	1,06	1,10	1,17
	23	1,15	1,30	1,34	1,43	1,51	1,60	1,68	1,25	1,34	1,44	1,63	1,61	1,70	1,78
24	1,55	1,67	1,77	1,89	2,00	2,11	2,23	1,68	1,80	1,90	2,02	2,13	2,25	2,36	
25	1,95	2,09	2,24	2,39	2,53	2,67	2,71	2,11	2,25	2,40	2,55	2,69	2,83	2,97	
26	2,36	2,54	2,71	2,89	3,04	3,20	3,35	2,55	2,73	2,90	3,07	3,22	3,38	3,54	
27	2,79	2,99	3,18	3,38	3,57	3,75	3,92	3,01	3,20	3,40	3,59	3,78	3,96	4,13	
28	3,20	3,44	3,66	3,89	4,11	4,32	4,53	3,46	3,69	3,93	4,15	4,36	4,58	4,77	
29	3,66	3,92	4,15	4,40	4,64	4,87	5,08	3,95	4,20	4,43	4,68	4,92	5,15	5,36	
30	4,11	4,37	4,66	4,94	5,22	5,46	5,71	4,42	4,68	4,97	5,25	5,53	5,77	6,02	

**Table 4**

**Corrections c de température sur la masse volumique des MOUTS mesurée à t °C à l'aide d'un pycnomètre en VERRE PYREX, pour ramener les résultats à 20 °C**

$$\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000. (-) \text{ si } t \text{ °C est inférieure à } 20 \text{ °C et } (+) \text{ si } t \text{ °C est supérieure à } 20 \text{ °C}$$

		Masses volumiques																					
		1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15	1,16	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26	1,28	1,30	1,32	1,34	1,36
Températures en °C	10	2,31	2,48	2,66	2,82	2,99	3,13	3,30	3,44	3,59	3,73	3,88	4,01	4,28	4,52	4,76	4,98	5,18	5,42	5,56	5,73	5,90	6,05
	11	2,12	2,28	2,42	2,57	2,72	2,86	2,99	3,12	3,25	3,37	3,50	3,62	3,85	4,08	4,29	4,48	4,67	4,84	5,00	5,16	5,31	5,45
	12	1,92	2,06	2,19	2,32	2,45	2,58	2,70	2,92	2,94	3,04	3,15	3,26	3,47	3,67	3,85	4,03	4,20	4,36	4,51	4,65	4,78	4,91
	13	1,72	1,84	1,95	2,06	2,17	2,27	2,38	2,48	2,58	2,69	2,78	2,89	3,05	3,22	3,39	3,55	3,65	3,84	3,98	4,11	4,24	4,36
	14	1,52	1,62	1,72	1,81	1,90	2,00	2,09	2,17	2,26	2,34	2,43	2,51	2,66	2,82	2,96	3,09	3,22	3,34	3,45	3,56	3,67	3,76
	15	1,28	1,36	1,44	1,52	1,60	1,67	1,75	1,82	1,89	1,96	2,04	2,11	2,24	2,36	2,48	2,59	2,69	2,79	2,88	2,97	3,03	3,10
	16	1,05	1,12	1,18	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,55	1,60	1,66	1,71	1,81	1,90	2,00	2,08	2,16	2,24	2,30	2,37	2,43	2,49
	17	0,80	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,09	1,13	1,18	1,22	1,26	1,30	1,37	1,44	1,51	1,57	1,62	1,68	1,72	1,76	1,80	1,84
	18	0,56	0,59	0,62	0,66	0,68	0,72	0,75	0,77	0,80	0,83	0,85	0,88	0,93	0,98	1,02	1,05	1,09	1,12	1,16	1,19	1,21	1,24
	19	0,29	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,42	0,43	0,44	0,45	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56	0,57	0,59	0,60	0,61	0,62
	20																						
	21	0,29	0,30	0,32	0,34	0,35	0,37	0,38	0,40	0,41	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0,56	0,58	0,59	0,60	0,61	0,62	0,62
	22	0,58	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,79	0,81	0,84	0,87	0,90	0,96	1,03	1,05	1,09	1,12	1,15	1,18	1,20	1,22	1,23
	23	0,89	0,94	0,99	1,03	1,08	1,12	1,16	1,20	1,25	1,29	1,33	1,37	1,44	1,51	1,57	1,63	1,67	1,73	1,77	1,80	1,82	1,94
	24	1,20	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,54	1,60	1,66	1,71	1,77	1,82	1,92	2,01	2,10	2,17	2,24	2,30	2,36	2,40	2,42	2,44
	25	1,51	1,59	1,66	1,74	1,81	1,88	1,95	2,02	2,09	2,16	2,23	2,30	2,42	2,53	2,63	2,72	2,82	2,89	2,95	2,99	3,01	3,05
	26	1,84	1,92	2,01	2,10	2,18	2,26	2,34	2,42	2,50	2,58	2,65	2,73	2,87	3,00	3,13	3,25	3,36	3,47	3,57	3,65	3,72	3,79
	27	2,17	2,26	2,36	2,46	2,56	2,66	2,75	2,84	2,93	3,01	3,10	3,18	3,35	3,50	3,66	3,80	3,93	4,06	4,16	4,26	4,35	4,42
	28	2,50	2,62	2,74	2,85	2,96	3,07	3,18	3,28	3,40	3,50	3,60	3,69	3,87	4,04	4,21	4,36	4,50	4,64	4,75	4,86	4,94	5,00
	29	2,86	2,98	3,10	3,22	3,35	3,47	3,59	3,70	3,82	3,93	4,03	4,14	4,34	4,53	4,72	4,89	5,05	5,20	5,34	5,46	5,56	5,64
30	3,20	3,35	3,49	3,64	3,77	3,91	4,05	4,17	4,30	4,43	4,55	4,67	4,90	5,12	5,39	5,51	5,68	5,94	5,96	6,09	6,16	6,22	

**Table 5**

**Corrections de température sur la masse volumique des VINS SECS et des vins secs débarrassés d'alcool, mesurée dans un pycnomètre en VERRE  
PYREX à t °C pour la ramener à 20 °C,**

$$\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000. (-) \text{ si } t \text{ °C est inférieure à } 20 \text{ °C et } (+) \text{ si } t \text{ °C est supérieure à } 20 \text{ °C}$$

		Titres alcoométriques																									
		0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
Températures en °C	10	1,59	1,64	1,67	1,71	1,77	1,84	1,91	2,01	2,11	2,22	2,34	2,46	2,60	2,73	2,88	3,03	3,19	3,35	3,52	3,70	3,87	4,06	4,25	4,44		
	11	1,48	1,53	1,56	1,60	1,64	1,70	1,77	1,86	1,95	2,05	2,16	2,27	2,38	2,51	2,63	2,77	2,91	3,06	3,21	3,36	3,53	3,69	3,86	4,03		
	12	1,36	1,40	1,43	1,46	1,50	1,56	1,62	1,69	1,78	1,86	1,96	2,05	2,16	2,27	2,38	2,50	2,62	2,75	2,88	3,02	3,16	3,31	3,46	3,61		
	13	1,22	1,26	1,28	1,32	1,35	1,40	1,45	1,52	1,59	1,67	1,75	1,83	1,92	2,01	2,11	2,22	2,32	2,44	2,55	2,67	2,79	2,92	3,05	3,18		
	14	1,08	1,11	1,13	1,16	1,19	1,23	1,27	1,33	1,39	1,46	1,52	1,60	1,67	1,75	1,94	1,93	2,03	2,11	2,21	2,31	2,42	2,52	2,63	2,74,		
	15	0,92	0,96	0,97	0,99	1,02	1,05	1,09	1,13	1,19	1,24	1,30	1,36	1,42	1,48	1,55	1,63	1,70	1,78	1,86	1,95	2,03	2,12	2,21	2,30		
	16	0,76	0,79	0,80	0,81	0,94	0,86	0,89	0,93	0,97	1,01	1,06	1,10	1,16	1,21	1,26	1,32	1,38	1,44	1,51	1,57	1,64	1,71	1,78	1,85		
	17	0,59	0,61	0,62	0,63	0,65	0,67	0,69	0,72	0,75	0,78	0,81	0,85	0,88	0,95	0,96	1,01	1,05	1,11	1,15	1,20	1,25	1,30	1,35	1,40		
	18	0,40	0,42	0,42	0,43	0,44	0,46	0,47	0,49	0,51	0,53	0,55	0,57	0,60	0,63	0,65	0,68	0,71	0,74	0,77	0,81	0,84	0,87	0,91	0,94		
	19	0,21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,42	0,44	0,46	0,47		
	20																										
	21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,38	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48		
	22	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48	0,49	0,51	0,52	0,54	0,56	0,59	0,61	0,63	0,66	0,69	0,71	0,74	0,77	0,80	0,83	0,87	0,90	0,93	0,97		
	23	0,68	0,70	0,71	0,72	0,74	0,76	0,78	0,80	0,83	0,86	0,90	0,93	0,96	1,00	1,03	1,08	1,13	1,17	1,22	1,26	1,31	1,37	1,41	1,46		
	24	0,93	0,96	0,97	0,99	1,01	1,03	1,06	1,10	1,13	1,18	1,22	1,26	1,31	1,36	1,41	1,47	1,52	1,58	1,64	1,71	1,77	1,84	1,90	1,97		
	25	1,19	1,23	1,25	1,27	1,29	1,32	1,36	1,40	1,45	1,50	1,55	1,61	1,67	1,73	1,80	1,86	1,93	2,00	2,08	2,16	2,24	2,32	2,40	2,48		
	26	1,47	1,51	1,53	1,56	1,59	1,62	1,67	1,72	1,77	1,83	1,90	1,96	2,03	2,11	2,19	2,27	2,35	2,44	2,53	2,62	2,72	2,81	2,91	3,01		
	27	1,75	1,80	1,82	1,85	1,89	1,93	1,98	2,04	2,11	2,18	2,25	2,33	2,41	2,50	2,59	2,68	2,78	2,88	2,98	3,09	3,20	3,31	3,42	3,53		
	28	2,04	2,10	2,13	2,16	2,20	2,25	2,31	2,38	2,45	2,53	2,62	2,70	2,80	2,89	3,00	3,10	3,21	3,32	3,45	3,57	3,69	3,82	3,94	4,07		
	29	2,34	2,41	2,44	2,48	2,53	2,58	2,65	2,72	2,81	2,89	2,99	3,09	3,19	3,30	3,42	3,53	3,65	3,78	3,92	4,05	4,19	4,33	4,47	4,61		
30	2,66	2,73	2,77	2,81	2,86	2,92	3,00	3,08	3,17	3,27	3,37	3,48	3,59	3,72	3,84	3,97	4,11	4,25	4,40	4,55	4,70	4,85	4,92	5,17			

**Table 6**

**Corrections de températures sur la masse volumique des VINS DE LIQUEUR mesurée à l'aide d'un pycnomètre en VERRE PYREX, à t °C pour la  
Ramener à 20 °C**

$$\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000. (-) \text{ si } t \text{ °C est inférieure à } 20 \text{ °C et } (+) \text{ si } t \text{ °C est supérieure à } 20 \text{ °C}$$

		Vins de 13% vol,							Vins de 15% vol,							Vins de 17% vol,						
		Masses volumiques							Masses volumiques							Masses volumiques						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Températures en °C	10	2,36	2,71	3,06	3,42	3,72	3,96	4,32	2,64	2,99	3,36	3,68	3,99	4,30	4,59	2,94	3,29	3,64	3,98	4,29	4,60	4,89
	11	2,17	2,49	2,80	2,99	3,39	3,65	3,90	2,42	2,73	3,05	3,34	3,63	3,89	4,15	2,69	3,00	3,32	3,61	3,90	4,16	4,41
	12	1,97	2,25	2,53	2,79	3,05	3,29	3,52	2,19	2,47	2,75	3,01	3,27	3,51	3,73	2,42	2,70	2,98	3,24	3,50	3,74	3,96
	13	1,78	2,02	2,25	2,47	2,69	2,89	3,09	1,97	2,21	2,44	2,66	2,87	3,08	3,29	2,18	2,42	2,64	2,87	3,08	3,29	3,49
	14	1,57	1,78	1,98	2,16	2,35	2,53	2,70	1,74	1,94	2,14	2,32	2,52	2,69	2,86	1,91	2,11	2,31	2,50	2,69	2,86	3,03
	15	1,32	1,49	1,66	1,82	1,97	2,12	2,26	1,46	1,63	1,79	1,95	2,10	2,25	2,39	1,60	1,77	1,93	2,09	2,24	2,39	2,53
	16	1,08	1,22	1,36	1,48	1,61	1,73	1,84	1,18	1,32	1,46	1,59	1,71	1,83	1,94	1,30	1,44	1,58	1,71	1,83	1,95	2,06
	17	0,83	0,94	1,04	1,13	1,22	1,31	1,40	0,91	1,02	1,12	1,21	1,30	1,39	1,48	1,00	1,10	1,20	1,30	1,39	1,48	1,56
	18	0,58	0,64	0,71	0,78	0,84	0,89	0,95	0,63	0,69	0,76	0,83	0,89	0,94	1,00	0,69	0,75	0,82	0,89	0,95	1,00	1,06
	19	0,30	0,34	0,37	0,40	0,43	0,46	0,49	0,33	0,37	0,40	0,43	0,46	0,49	0,52	0,36	0,39	0,42	0,46	0,49	0,52	0,54
	20																					
21	0,30	0,33	0,36	0,40	0,43	0,46	0,49	0,33	0,36	0,39	0,43	0,46	0,49	0,51	0,35	0,39	0,42	0,45	0,48	0,51	0,54	
22	0,60	0,67	0,73	0,80	0,85	0,91	0,98	0,65	0,72	0,78	0,84	0,90	0,96	1,01	0,71	0,78	0,84	0,90	0,96	1,01	1,07	
23	0,93	1,02	1,12	1,22	1,30	1,39	1,49	1,01	1,10	1,20	1,29	1,38	1,46	1,55	1,10	1,19	1,29	1,38	1,46	1,55	1,63	
24	1,27	1,39	1,50	1,61	1,74	1,84	1,95	1,37	1,49	1,59	1,72	1,84	1,95	2,06	1,48	1,60	1,71	1,83	1,95	2,06	2,17	
25	1,61	1,75	1,90	2,05	2,19	2,33	2,47	1,73	1,87	2,02	2,17	2,31	2,45	2,59	1,87	2,01	2,16	2,31	2,45	2,59	2,73	
26	1,94	2,12	2,29	2,47	2,63	2,79	2,95	2,09	2,27	2,44	2,62	2,78	2,94	3,10	2,26	2,44	2,61	2,79	2,95	3,11	3,26	
27	2,30	2,51	2,70	2,90	3,09	3,27	3,44	2,48	2,68	2,87	3,07	3,27	3,45	3,62	2,67	2,88	3,07	3,27	3,46	3,64	3,81	
28	2,66	2,90	3,13	3,35	3,57	3,86	4,00	2,86	3,10	3,23	3,55	3,77	3,99	4,20	3,08	3,31	3,55	3,76	3,99	4,21	4,41	
29	3,05	3,31	3,56	3,79	4,04	4,27	4,49	3,28	3,53	3,77	4,02	4,26	4,49	4,71	3,52	3,77	4,01	4,26	4,50	4,73	4,95	
30	3,44	3,70	3,99	4,28	4,54	4,80	5,06	3,68	3,94	4,23	4,52	4,79	5,05	5,30	3,95	4,22	4,51	4,79	5,07	5,32	5,57	

**Table 6 (suite)**

Corrections de températures sur la masse volumique des VINS DE LIQUEUR mesurée à l'aide d'un pycnomètre en VERRE PYREX, à t °C pour la ramener à 20 °C,  
 $\rho_{20} = \rho_t \pm c/1000$ . (-) si t °C est inférieure à 20 °C et (+) si t °C est supérieure à 20 °C

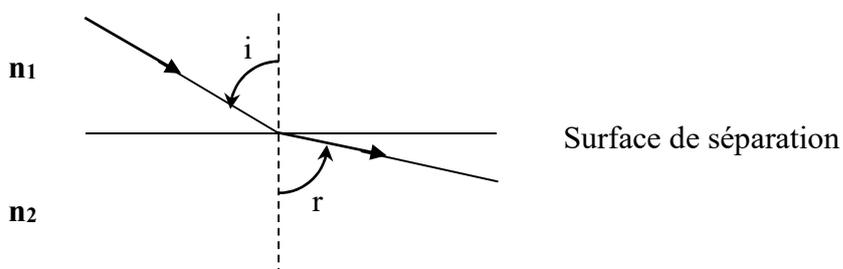
		Vins de 19% vol,							Vins de 21% vol,						
		Masses volumiques							Masses volumiques						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,000	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Températures en °C	10	3,27	3,62	3,97	4,30	4,62	4,92	5,21	3,62	3,97	4,32	4,66	4,97	5,27	5,56
	11	2,99	3,30	3,61	3,90	4,19	4,45	4,70	3,28	3,61	3,92	4,22	4,50	4,76	5,01
	12	2,68	2,96	3,24	3,50	3,76	4,00	4,21	2,96	3,24	3,52	3,78	4,03	4,27	4,49
	13	2,68	2,96	3,24	3,50	3,76	4,00	4,21	2,96	3,24	3,52	3,78	4,03	4,27	4,49
	14	2,11	2,31	2,51	2,69	2,88	3,05	3,22	2,31	2,51	2,71	2,89	3,08	3,25	3,43
	15	1,76	1,93	2,09	2,25	2,40	2,55	2,69	1,93	2,10	2,26	2,42	2,57	2,72	2,86
	16	1,43	1,57	1,70	1,83	1,95	2,08	2,18	1,56	1,70	1,84	1,97	2,09	2,21	2,32
	17	1,09	1,20	1,30	1,39	1,48	1,57	1,65	1,20	1,31	1,41	1,50	1,59	1,68	1,77
	18	0,76	0,82	0,88	0,95	1,01	1,06	1,12	0,82	0,88	0,95	1,01	1,08	1,13	1,18
	19	0,39	0,42	0,45	0,49	0,52	0,55	0,57	0,42	0,46	0,49	0,52	0,55	0,58	0,61
	20														
	21	0,38	0,42	0,45	0,48	0,51	0,54	0,57	0,41	0,45	0,48	0,51	0,54	0,57	0,60
	22	0,78	0,84	0,90	0,96	1,02	1,07	1,13	0,84	0,90	0,96	1,02	1,08	1,14	1,19
	23	1,19	1,28	1,38	1,47	1,55	1,64	1,72	1,29	1,39	1,48	1,57	1,65	1,74	1,82
	24	1,60	1,72	1,83	1,95	2,06	2,18	2,29	1,73	1,85	1,96	2,08	2,19	2,31	2,42
	25	2,02	2,16	2,31	2,46	2,60	2,74	2,88	2,18	2,32	2,47	2,62	2,76	2,90	3,04
26	2,44	2,62	2,79	2,96	3,12	3,28	3,43	2,53	2,81	2,97	3,15	3,31	3,47	3,62	
27	2,88	3,08	3,27	3,42	3,66	3,84	4,01	3,10	3,30	3,47	3,69	3,88	4,06	4,23	
28	3,31	3,54	3,78	4,00	4,22	4,44	4,64	3,56	3,79	4,03	4,25	4,47	4,69	4,89	
29	3,78	4,03	4,27	4,52	4,76	4,99	5,21	4,06	4,31	4,55	4,80	5,04	5,27	5,48	
30	4,24	4,51	4,80	5,08	5,36	5,61	5,86	4,54	4,82	5,11	5,39	5,66	5,91	6,16	

## 2.2 Sucres

### 2.2.1 Richesse en sucres : méthode par réfractométrie

#### DEFINITION ET PRINCIPE

En optique géométrique, un rayon lumineux arrivant sur la surface de séparation plane de 2 milieux transparents différents, donne naissance dans le deuxième milieu à un rayon, dit rayon réfracté, qui se propage dans une direction différente de celle suivie, par le rayon incident.



Ce phénomène obéit à la loi Snell Descartes, dite loi de la réfraction qui énonce que le rapport de sinus de l'angle d'incidence ( $i$ ) au sinus de l'angle de réfraction ( $r$ ) est une constante pour le milieu déterminé. Cette constante est l'indice de réfraction du milieu ( $n$ ).

$$n = \sin i / \sin r$$

L'indice de réfraction de l'eau (par rapport à l'air) est 1,333. Si l'on dissout une substance dans l'eau, par exemple du saccharose, l'indice de réfraction du liquide est augmenté, et d'autant plus que la quantité dissoute est plus grande.

La mesure de l'indice de réfraction peut donc servir à déterminer la proportion des corps dissous dans l'eau. Les appareils utilisés dans les industries alimentaires ou en œnologie sont gradués généralement directement en matières extractives, comptées comme saccharose pour 100 g de solution. Parmi les différents appareils existants, on retiendra le réfractomètre à main, d'un emploi fréquent sur le terrain en œnologie, pour évaluer la quantité de sucres dans le moût.

Après correction de température (Table 7), l'indice de réfraction à 20 °C, exprimé en indice absolu ou en pourcentage en masse de saccharose, est reporté dans la Table 8 et on en déduit la teneur en sucres du liquide analysé.

#### MODE OPERATOIRE

##### ETALONNAGE

Après avoir soigneusement lavé et essuyé le prisme du réfractomètre, déposer 2 gouttes d'eau distillée sur ce prisme, puis rabattre le volet. Vérifier ainsi que la limite de séparation entre les deux plages correspond bien au zéro de la graduation, ceci à 20°C.

##### MESURE

- Amener l'échantillon à une température voisine de 20°C,
- Après avoir nettoyé l'appareil, déposer une petite prise d'essai (2 gouttes) de moût sur le prisme du réfractomètre en veillant à ce que celle-ci couvre uniformément la surface du verre,

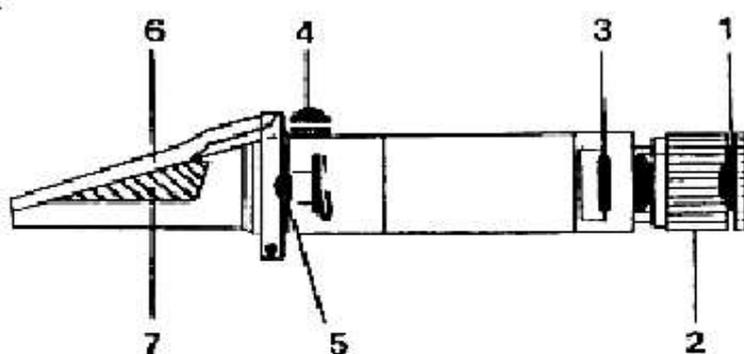
- Rabattre immédiatement le volet mobile, s'assurer qu'il plaque bien et que toute la surface du prisme est recouverte de liquide,
- Porter l'oculaire à l'œil et diriger l'instrument vers une source de lumière,

La lecture doit être faite aussitôt après le dépôt de jus sucré car l'évaporation qui se produit sur les bords de la lame de jus modifie peu à peu la concentration et l'indice du liquide placé sur le prisme. La ligne de séparation devient alors floue et toute mesure est impossible.

- On observe dans l'appareil une échelle graduée et une surface divisée en deux champs, l'un clair, l'autre sombre,
- Tourner l'oculaire pour le régler selon la vue de l'opérateur, de façon que l'échelle soit parfaitement nette : la ligne de séparation des deux champs est alors nette également,

Lire : - la graduation correspondante à la ligne de séparation des deux plages (indice de réfraction exprimé en « matière sèches », c'est à dire en g de sucre pur contenu dans 100 g de solution de sucre ayant le même indice que l'échantillon). Par exemple, l'indice mesuré sur la figure est 16,8 g de matières sèches, c'est-à-dire qu'il est identique à l'indice d'une solution de sucre pur à 16,8 g pour 100 g de solution.

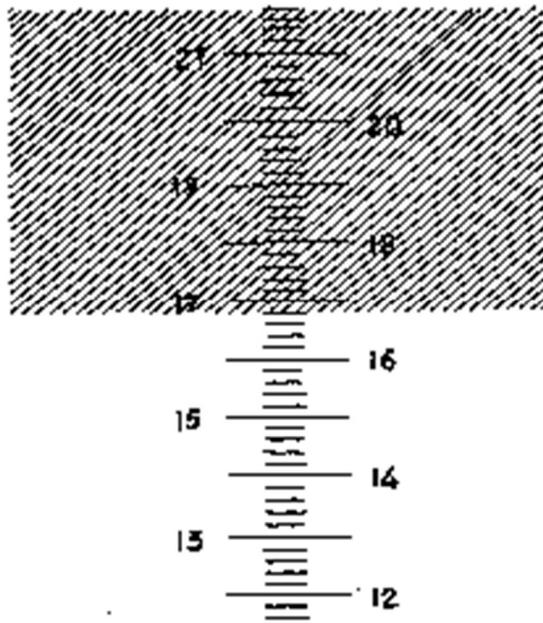
- la température en °C à laquelle est effectuée la mesure (thermomètre incorporé dans l'appareil). Cette mesure doit être faite à un ½ degré près (s'aider d'une loupe si nécessaire).



- |   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. Oculaire                             | 5. Lentille               |
| 2. Bouton de mise au point de l'échelle | 6. Couvercle de plastique |
| 3. Échelle                              | 7. Prisme                 |
| 4. Bouton d'étalonnage de l'échelle     |                           |

#### NETTOYAGE

- La mesure terminée, nettoyer très soigneusement à l'eau à deux reprises successives, la surface du prisme, puis l'essuyer avec un papier-mouchoir sec en appuyant très légèrement.
- Eviter de mouiller le tube du réfractomètre lors de ce nettoyage.



#### *CORRECTIONS THERMIQUES DES JUS SUCRES*

Le réfractomètre est livré réglé pour une température normale de 20 °C (sur demande spéciale pour les pays chauds, ils peuvent l'être à 28 °C).

Si la température à laquelle la mesure est effectuée diffère de 20 °C (ou 28 °C) on doit corriger l'indice lu (Table 2). La correction est d'autant plus forte et nécessaire que l'écart de température est plus élevé et que la concentration en matières sèches est plus grande.

Exemple : Par réfractométrie, la teneur en saccharose trouvée est de 16 g / 100 g pour un jus de raisin à 22 °C. D'après la table 7 de correction des températures, ceci correspond à 16 + 0,14 g / 100 g de matière sèche à ajouter.

En se référant à la table 8, on peut calculer la teneur en sucre et le titre alcoométrique probable des moûts de raisin naturels.

16,1 g de sucre/100g = 148,1 g de sucres par litre de moût

16,2 g/100g = 149,2 g de sucres par litre de moût.

→ 0,1 g/100g = 1,1 g/L

→ 0,04 g/100g = 0,44 g/L

Donc : 16,14 g de sucre / 100 g = 148,1 + 0,44 g  
= 148,54 g/L

**Table 7**

**Correction à apporter dans le cas où le pourcentage en masse de saccharose a été déterminé à une température différente de 20 °C**

Température °C	Saccharose en grammes pour 100 g de produit									
	5	10	15	20	30	40	50	60	70	75
	Soustraire									
15°	0,25	0,27	0,31	0,31	0,34	0,35	0,36	0,37	0,36	0,36
16°	0,21	0,23	0,27	0,27	0,29	0,31	0,31	0,32	0,31	0,23
17°	0,16	0,18	0,20	0,20	0,22	0,23	0,23	0,23	0,20	0,17
18°	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,16	0,15	0,12	0,12	0,09
19°	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,07	0,05
	Additionner									
21°	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
22°	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
23°	0,18	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22
24°	0,24	0,26	0,26	0,27	0,28	0,28	0,28	0,28	0,29	0,29
25°	0,30	0,32	0,32	0,34	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,37

**Table 8**

**Table donnant la teneur en sucres des MOUTS en grammes par litre et en grammes par kilogramme, déterminée au moyen d'un réfractomètre gradué, soit en pourcentage en masse de saccharose à 20 °C, soit en indice de réfraction à 20 °C. La masse volumique à 20 °C est également donnée.**

Saccharose % (m/m)	Indice de Réfraction à 20 °C	Masse Volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
10,0	1,34781	1,0390	82,3	79,2
10,1	1,34798	1,0394	83,4	80,2
10,2	1,34814	1,0398	84,5	81,3
10,3	1,34830	1,0402	85,6	82,2
10,4	1,34845	1,0406	86,6	83,2
10,5	1,34860	1,0410	87,6	84,1
10,6	1,34875	1,0414	88,6	85,1
10,7	1,34890	1,0419	89,7	86,1
10,8	1,34906	1,0423	90,8	87,1
10,9	1,34921	1,0427	91,8	88,1
11,0	1,34936	1,0431	92,9	89,1
11,1	1,34952	1,0435	94,0	90,0
11,2	1,34968	1,0439	95,0	91,0
11,3	1,34984	1,0443	96,1	92,0
11,4	1,34999	1,0447	97,1	92,9
11,5	1,35015	1,0452	98,2	94,0
11,6	1,35031	1,0456	99,3	95,0
11,7	1,35046	1,0460	100,3	95,9
11,8	1,35062	1,0464	101,4	96,9
11,9	1,35077	1,0468	102,5	97,9
12,0	1,35092	1,0473	103,6	98,9
12,1	1,35108	1,0477	104,7	99,9
12,2	1,35124	1,0481	105,7	100,8
12,3	1,35140	1,0485	106,8	101,9
12,4	1,35156	1,0489	107,9	102,9
12,5	1,35172	1,0494	109,0	103,8
12,6	1,35187	1,0498	110,0	104,8
12,7	1,35203	1,0502	111,1	105,8
12,8	1,35219	1,0506	112,2	106,8
12,9	1,35234	1,0510	113,2	107,8
13,0	1,35249	1,0514	114,3	108,7
13,1	1,35266	1,0519	115,4	109,7
13,2	1,35282	1,0523	116,5	110,7
13,3	1,35298	1,0527	117,6	111,7
13,4	1,35313	1,0531	118,6	112,6
13,5	1,35329	1,0536	119,7	113,6
13,6	1,35345	1,0540	120,8	114,6
13,7	1,35360	1,0544	121,8	115,6
13,8	1,35376	1,0548	122,9	116,5
14,8	1,35535	1,0591	133,8	126,3
14,9	1,35551	1,0595	134,9	127,3

**Table 8 (suite)**

Saccharose % (m/m)	Indice de Réfraction à 20 °C	Masse Volumique à 20°C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
15,0	1,35567	1,0599	136,0	128,3
15,1	1,35583	1,0603	137,1	129,3
15,2	1,35599	1,0608	138,2	130,3
15,3	1,35615	1,0612	139,3	131,3
15,4	1,35631	1,0616	140,4	132,3
15,5	1,35648	1,0621	141,5	133,2
15,6	1,35664	1,0625	142,6	134,2
15,7	1,35680	1,0629	143,7	135,2
15,8	1,35696	1,0633	144,8	136,2
15,9	1,35712	1,0638	145,9	137,2
16,0	1,35728	1,0642	147,0	138,1
16,1	1,35744	1,0646	148,1	139,1
16,2	1,35760	1,0651	149,2	140,1
16,3	1,35776	1,0655	150,3	141,1
16,4	1,35793	1,0660	151,5	142,1
16,5	1,35809	1,0664	152,6	143,1
16,6	1,35825	1,0668	153,7	144,1
16,7	1,35842	1,0672	154,8	145,0
16,8	1,35858	1,0677	155,9	146,0
16,9	1,35874	1,0681	157,0	147,0
17,0	1,35890	1,0685	158,1	148,0
17,1	1,35907	1,0690	159,3	149,0
17,2	1,35923	1,0694	160,4	150,0
17,3	1,35939	1,0699	161,5	151,0
17,4	1,35955	1,0703	162,6	151,9
17,5	1,35972	1,0707	163,7	152,9
17,6	1,35988	1,0711	164,8	153,9
17,7	1,36004	1,0716	165,9	154,8
17,8	1,36020	1,0720	167,0	155,8
17,9	1,36036	1,0724	168,1	156,8
18,0	1,36053	1,0729	169,3	157,8
18,1	1,36070	1,0733	170,4	158,8
18,2	1,36086	1,0738	171,5	159,7
18,3	1,36102	1,0742	172,6	160,7
18,4	1,36119	1,0746	173,7	161,6
18,5	1,36136	1,0751	174,9	162,6
18,6	1,36152	1,0755	176,0	163,6
18,7	1,36169	1,0760	177,2	164,6
18,8	1,36185	1,0764	178,3	165,6
18,9	1,36201	1,0768	179,4	166,6
19,0	1,36217	1,0773	180,5	167,6
19,1	1,36234	1,0777	181,7	168,6
19,2	1,36251	1,0782	182,8	169,5
19,3	1,36267	1,0786	183,9	170,5
19,4	1,36284	1,0791	185,1	171,5
19,5	1,36301	1,0795	186,3	172,5
19,6	1,36318	1,0800	187,4	173,5
19,7	1,36335	1,0804	188,6	174,5
19,8	1,36351	1,0809	189,7	175,5
19,9	1,36367	1,0813	190,8	176,5

**Table 8 (suite)**

Saccharose % (m/m)	Indice de Réfraction à 20 °C	Masse Volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
20,0	1,36383	1,0817	191,9	177,4
20,1	1,36400	1,0822	193,1	178,4
20,2	1,36417	1,0826	194,2	179,4
20,3	1,36434	1,0831	195,3	180,4
20,4	1,36451	1,0835	196,5	181,4
20,5	1,36468	1,0840	197,7	182,3
20,6	1,36484	1,0844	198,8	183,3
20,7	1,36501	1,0849	200,0	184,3
20,8	1,36518	1,0853	201,1	185,3
20,9	1,36534	1,0857	202,2	186,2
21,0	1,36550	1,0862	203,3	187,2
21,1	1,36568	1,0866	204,5	188,2
21,2	1,36585	1,0871	205,7	189,2
21,3	1,36601	1,0875	206,8	190,2
21,4	1,36618	1,0880	207,9	191,1
21,5	1,36635	1,0884	209,1	192,1
21,6	1,36652	1,0889	210,3	193,1
21,7	1,36669	1,0893	211,4	194,1
21,8	1,36685	1,0897	212,5	195,0
21,9	1,36702	1,0902	213,6	196,0
22,0	1,36719	1,0906	214,8	196,9
22,1	1,36736	1,0911	216,0	198,0
22,2	1,36753	1,0916	217,2	199,0
22,3	1,36770	1,0920	218,3	199,9
22,4	1,36787	1,0925	219,5	200,9
22,5	1,36804	1,0929	220,6	201,8
22,6	1,36820	1,0933	221,7	202,8
22,7	1,36837	1,0938	222,9	203,8
22,8	1,36854	1,0943	224,1	204,8
22,9	1,36871	1,0947	225,2	205,8
23,0	1,36888	1,0952	226,4	206,7
23,1	1,36905	1,0956	227,6	207,7
23,2	1,36922	1,0961	228,7	208,7
23,3	1,36959	1,0965	229,9	209,7
23,4	1,36956	1,0970	231,1	210,7
23,5	1,36973	1,0975	232,3	211,6
23,6	1,36991	1,0979	233,4	212,6
23,7	1,37008	1,0984	234,6	213,6
23,8	1,37025	1,0988	235,8	214,6
23,9	1,37042	1,0993	237,0	215,6
24,0	1,37059	1,0998	238,2	216,6
24,1	1,37076	1,1007	239,3	217,4
24,2	1,37093	1,1011	240,3	218,2
24,3	1,37110	1,1016	241,6	219,4
24,4	1,37128	1,1022	243,0	220,5
24,5	1,37145	1,1026	244,0	221,3
24,6	1,37162	1,1030	245,0	222,1
24,7	1,37180	1,1035	246,4	223,2
24,8	1,37197	1,1041	247,7	224,4
24,9	1,37214	1,1045	248,7	225,2

**Table 8 (suite)**

Saccharose % (m/m)	Indice de Réfraction à 20 °C	Masse Volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg
25,0	1,37232	1,1049	249,7	226,0
25,1	1,37249	1,1053	250,7	226,8
25,2	1,37266	1,1057	251,7	227,6
25,3	1,37283	1,1062	253,0	228,7
25,4	1,37300	1,1068	254,4	229,9
25,5	1,37317	1,1072	255,4	230,7
25,6	1,37335	1,1076	256,4	231,5
25,7	1,37353	1,1081	257,8	232,6
25,8	1,37370	1,1087	259,1	233,7
25,9	1,37387	1,1091	260,1	234,5
26,0	1,37405	1,1095	261,1	235,3
26,1	1,37423	1,1100	262,5	236,4
26,2	1,37440	1,1106	263,8	237,5
26,3	1,37457	1,1110	264,8	238,3
26,4	1,37475	1,1114	265,8	239,2
26,5	1,37493	1,1119	267,2	240,3
26,6	1,37510	1,1125	268,5	241,4
26,7	1,37528	1,1129	269,5	242,2
26,8	1,37545	1,1133	270,5	243,0
26,9	1,37562	1,1138	271,8	244,1
27,0	1,37580	1,1144	273,2	245,2
27,1	1,37598	1,1148	274,2	246,0
27,2	1,37615	1,1152	275,2	246,8
27,3	1,37632	1,1157	276,5	247,9
27,4	1,37650	1,1163	277,9	249,0
27,5	1,37667	1,1167	278,9	249,8
27,6	1,37685	1,1171	279,9	250,6
27,7	1,37703	1,1176	281,3	251,6
27,8	1,37721	1,1182	282,6	252,7
27,9	1,37739	1,1186	283,6	253,5
28,0	1,37757	1,1190	284,6	254,3
28,1	1,37775	1,1195	286,0	255,4
28,2	1,37793	1,1201	287,3	256,5
28,3	1,37810	1,1205	288,3	257,3
28,4	1,37828	1,1209	289,3	258,1
28,5	1,37846	1,1214	290,7	259,2
28,6	1,37863	1,1220	292,0	260,3
28,7	1,37881	1,1224	293,0	261,0
28,8	1,37899	1,1228	294,0	261,8
28,9	1,37917	1,1233	295,3	262,9
29,0	1,37935	1,1239	296,7	264,0
29,1	1,37953	1,1244	298,1	265,1
29,2	1,37971	1,1250	299,4	266,1
29,3	1,37988	1,1254	300,4	266,9
29,4	1,38006	1,1258	301,4	267,7
29,5	1,38024	1,1263	302,8	268,8
29,6	1,38042	1,1269	304,1	269,9
29,7	1,38060	1,1273	305,1	270,6
29,8	1,38078	1,1277	306,1	271,4
29,9	1,38096	1,1282	307,4	272,5

## 2.2.2 Dosage des sucres réducteurs

### **(a) Méthode de Luff-Schoorl (méthode officielle type IV)**

#### **INTRODUCTION**

Le jus de raisin contient du glucose et du fructose. La fermentation alcoolique consomme plus rapidement le glucose que le fructose. Le fructose prédomine donc pendant la fermentation et lorsque celle-ci s'achève, la petite quantité de sucres qui subsiste est surtout formée de fructose (ainsi qu'une petite quantité d'arabinose, rhamnose et de xylose).

Le glucose et le fructose possèdent à côté de leurs groupements alcool une fonction aldéhyde ou une fonction cétone qui leur confèrent la propriété de réduire quantitativement les sels cuivriques en oxyde de cuivre qui précipite. Ce dosage est donc basé sur le pouvoir réducteur des sucres.

Le glucose et le fructose, sucres réducteurs fermentescibles, peuvent être dosés individuellement par méthode enzymatique.

La détermination comporte deux opérations successives : la défécation pour le vin (ou une simple dilution pour le moût) et le dosage proprement dit. On cherche souvent à obtenir des concentrations en sucres réducteurs comprises entre **0,5 et 5 g/L**.

Si le vin est sec, il faut éviter de le diluer pendant la défécation ; s'il est doux, il faut le diluer tout en le déféquant, de manière à amener la teneur en sucres entre ces limites, suivant le tableau ci-dessous.

<b>Dénomination</b>	<b>Teneur en sucres (g/L) comprise entre</b>	<b>Masse volumique comprise entre</b>	<b>Dilution à prévoir</b>
Moûts de mistelles	125 et 350	> à 1,038	1/100
Vins doux, spiritueux ou non	12,5 et 125	1,005 à 1,038	1/25
Vins moelleux	5 et 25	0,997 à 1,006	1/5
Vins secs	< à 5	< 0,997	Pas de dilution

Les indications du tableau ci-dessus sont approximatives, et il est quelquefois nécessaire de recommencer le dosage des sucres après une nouvelle dilution si la teneur en sucre dépasse la limite de 5 g/L.

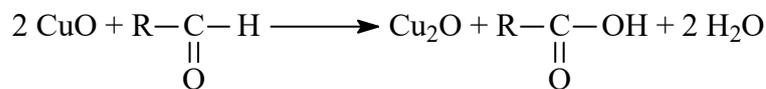
#### **PRINCIPE**

La méthode de dosage LUFF (méthode de référence) est basée sur la mesure de la quantité de cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  en excès (par Iodométrie).

Plus précisément, une partie aliquote de la liqueur déféquée réagit à chaud avec une solution cupro-alcaline. La solution cupro-alcaline ( $\text{CuSO}_4$  + acide citrique +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) est constituée

d'un oxyde de cuivre CuO, qui reste dissous en présence d'acide citrique. La liqueur a une couleur bleue intense.

Si on verse une solution de sucres réducteurs dans la solution cupro-alcaline, et si on chauffe, on provoque la réduction de l'oxyde cuivrique, CuO, qui précipite sous forme de petits grains rouge-brique d'oxyde cuivreux Cu<sub>2</sub>O selon la réaction :

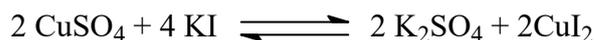


Oxyde cuivrique

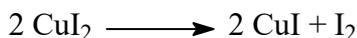
Oxyde cuivreux

Le poids d'oxyde cuivreux rouge-brique Cu<sub>2</sub>O obtenu dépend de nombreux facteurs : la température, la durée du temps de chauffage (10 min), le pH, la concentration en sucres.

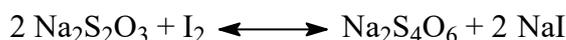
Après refroidissement, de l'acide sulfurique est ajouté pour transformer l'oxyde cuivrique (CuO) en excès en CuSO<sub>4</sub>. Les sels cuivriques (CuSO<sub>4</sub>) traités par un excès d'iodure de potassium (KI) en milieu acide libèrent 1 atome d'iode par atome de cuivre suivant les réactions :



CuI<sub>2</sub> n'est pas stable et se décompose immédiatement en donnant de l'iode :



L'équilibre est donc déplacé vers la droite et tout le cuivre précipité sous forme d'un précipité blanc ; il y a libération d'une quantité d'iode proportionnelle au cuivre à doser. Cet iode est dosé par le thiosulfate suivant les réactions :



Le dosage est effectué en présence d'empois d'amidon (indicateur de l'iode). Tant que de l'iode est libérée, il se combine avec l'amidon en donnant une coloration bleue-noir. Dès que toute l'iode est réduite par le thiosulfate, l'amidon redevient incolore. Cependant à la fin de la réaction le milieu est jaune grâce à la présence de l'iodure de plomb pour un VIN déféqué.

Un témoin est effectué en remplaçant la prise d'essai par un volume équivalent **d'eau distillée**. Dans le témoin, il n'y aura pas de réduction du CuO en Cu<sub>2</sub>O, et la quantité de CuSO<sub>4</sub>, et donc de CuI formé et donc de l'iode libérée, sera plus importante que dans le dosage lui-même. Le volume de thiosulfate utilisé *pour le dosage* du vin est soustrait du volume obtenu *pour le témoin*. Cette différence est utilisée dans un tableau de correspondance qui indique la quantité de sucre contenue dans la prise d'essai (mg) en fonction du volume de thiosulfate. A la fin de la réaction la couleur du témoin est un blanc cassé opaque.

## REACTIFS

- Empois d'amidon à 5 g par litre contenant 200 g de chlorure de sodium par litre pour assurer sa conservation. Cette solution doit être maintenue dix minutes à ébullition au moment de sa préparation.

**- Solution cupro-alkaline :**

Sulfate de cuivre pur ; CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	25 g
Acide citrique C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> , H <sub>2</sub> O	50 g
Carbonate de sodium cristallisé Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 10 H <sub>2</sub> O	388 g
Eau q.s.p.	1000 mL

Dissoudre le sulfate de cuivre dans 100 mL d'eau, l'acide citrique dans 300 mL d'eau et le carbonate de sodium dans 300 à 400 mL d'eau chaude. Mélanger la solution d'acide citrique et la solution de carbonate de sodium. Ajouter ensuite la solution de sulfate de cuivre et porter au litre.

**MODE OPERATOIRE**

Centrifuger 10 mL de moût à 3000 tours/min.

Prélever 1 mL (*pipette jaugée à 2 traits*) et diluer jusqu'à 200 mL (*fiolle jaugée*).

1. Ajouter 25 mL de la solution cupro-alkaline (*pipette jaugée à 2 traits*) à 25 mL de moût dilué (*pipette jaugée à 2 traits*) dans un erlenmeyer (300 mL)
2. Attacher à un système de réfrigération.
3. Ouvrir **l'eau d'abord** et ensuite allumer le bec bunsen électrique.
4. Porter à ébullition aussi rapidement que possible. Dès que la *première goutte recondense* dans le flacon, chauffer pendant encore 10 minutes exactement.
5. Arrêter le **bec bunsen électrique d'abord** et ensuite fermer l'eau.
6. Retirer l'erlenmeyer et refroidir rapidement sous un courant d'eau froide.
7. Ajouter 10 mL de KI à 30 % (m/v) et 25 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 % **lentement** : il y a formation de mousse
8. Ajouter 1 mL d'empois d'amidon et titrer avec le thiosulfate 0,1 N :
9. soit **n** mL le volume de thiosulfate versé
10. *NB* : virage au jaune (pour le vin)
11. Effectuer un dosage témoin dans lequel le moût dilué est remplacé par 25 mL d'eau distillée.

soit **n'** mL le volume de thiosulfate versé

*NB* : virage au blanc pour le témoin et le moût dilué

Calculer **n' – n** et se référer au tableau ci-dessous pour déterminer la quantité de sucre dans la prise d'essai. La quantité de sucres réducteurs est exprimée en grammes de sucre inverti par litre, à 0,1 g près. Elle se calcule alors de la façon suivante :

**Pour les MOUTS la prise d'essai est de 0,125 mL. La concentration en sucres (g/L) est donc :**

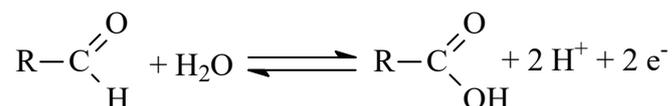
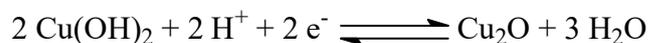
$$= \frac{\text{(mg de sucre dans la prise d'essai)}}{0,125}$$

<b>Solution de thiosulfate de sodium N/10 (n'-n)</b>	<b>Sucre inverti en mg dans la PRISE D'ESSAI</b>
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

## (b) *Méthode de Fehling (méthode non-officielle)*

### DEFINITION

Toutes les méthodes chimiques de dosage des sucres sont basées sur une réaction entre les fonctions aldéhydes des sucres et les ions  $\text{Cu}^{2+}$  d'une solution cuproalcaline.



Cette réaction n'est pas la seule à entrer en jeu; les autres ne sont pas entièrement connues, mais les résultats sont reproductibles si l'on opère dans les mêmes conditions (acidité, durée et température de chauffage).

Les méthodes diffèrent par ces conditions et par la façon de contrôler ces réactions. On peut :

- mesurer le volume du vin nécessaire pour réduire la totalité des ions cuivriques d'une solution cuproalcaline titrée (Méthode Fehling),
- doser les ions cuivreux formés (Méthode Bertrand)
- doser l'excès d'ions cuivriques n'ayant pas réagi (Méthode Lüff).

De plus la réaction doit être effectuée sur un vin déféqué, pour éliminer l'influence des substances autres que les sucres (tanins, polyphénols...) qui réduisent les solutions cuproalcalines.

### PRINCIPE

A chaud et en milieu alcalin, les sucres réduisent l'oxyde cuivrique ( $\text{CuO}$ ) apporté par la liqueur de Fehling, formant ainsi l'oxyde cuivreux ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) qui précipite. Quand la couleur bleue, due à  $\text{Cu}^{2+}$ , a totalement disparu, le dosage est terminé. La liqueur de Fehling utilisée est étalonnée à l'aide d'une solution contenant exactement 10 g/L de glucose. On détermine ainsi la quantité de sucres nécessaire pour réduire 10 mL de cette liqueur de Fehling.

Par comparaison, on pourra ensuite déterminer le titre en sucre de la solution à doser.

### MODE OPERATOIRE

#### Préparation d'une solution étalon de glucose à 1%

Peser 1 g de glucose

Dissoudre le glucose dans 100 mL d'eau distillée (fiolle jaugée)

#### • REACTIFS : LIQUEUR DE FEHLING

Liqueur A :       - 40 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$   
                      - 2 mL d'  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pur RP  
                      - eau distillée q.s.p 1000 mL

Liqueur B :       - Tartrate neutre de Sodium et de Potassium, ou Sel de Seignette 200g

- NaOH : 150 g (pastilles) ou 375 mL de lessive de soude
- eau distillée q.s.p 1000 mL

### ***Etalonnage de la liqueur de Fehling***

Introduire dans un erlenmeyer :

- 10 mL de solution A (pipette jaugée)
- 10 mL de solution B (éprouvette)
- 30 mL d'eau

*Nota : En mélangeant les deux solutions Fehling au moment de l'emploi, on évite que la liqueur de Fehling devienne auto-réductrice au cours de sa conservation.*

- Porter à ébullition, et verser goutte à goutte la solution de glucose à 10 g/L placée dans la burette. Maintenir l'ébullition entre chaque addition de glucose.
- Un précipité rouge d'oxyde cuivreux se forme : le surnageant bleu se décolore petit à petit. La fin du dosage est repérée par la disparition de la couleur bleue du surnageant due aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  non réduits.
- Noter le volume versé **V** en mL.

(Remarque : si le liquide devient jaune, il y a du sucre non oxydé : le terme de la réaction est dépassé.)

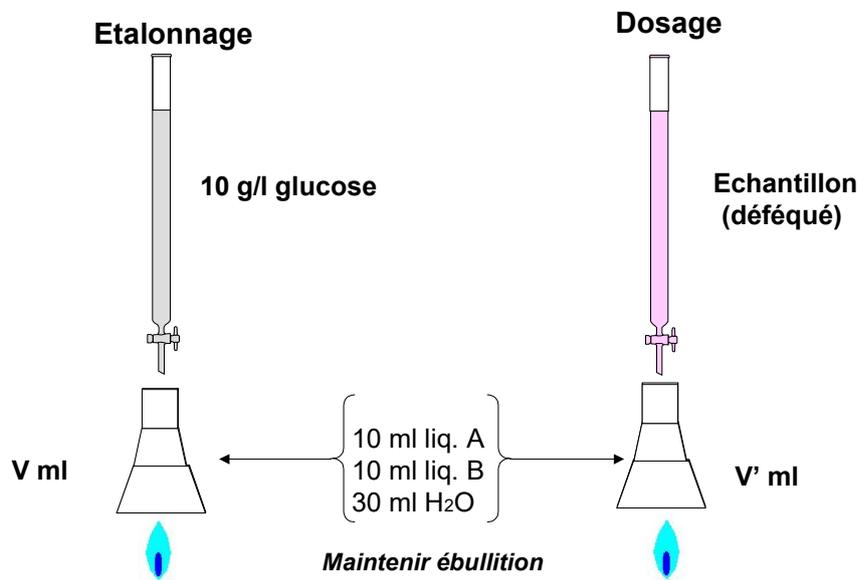
### **DOSAGE**

Diluer pour ramener la concentration en sucres du moût à une valeur inférieure à 5 g/L (soit une dilution entre 1/50 et 1/100). ***Utiliser des fioles jaugées.***

- Remplir la burette avec le moût dilué ou le déféquât du vin
- Verser dans un erlenmeyer :
  - 10 mL de solution A (***pipette jaugée***)
  - 10 mL de solution B (***éprouvette***)
  - 30 mL d'eau
- Porter à ébullition, et verser goutte à goutte le vin (défiqué et dilué) ou le moût (dilué) placé dans la burette, en opérant comme précédemment : noter le volume versé **V'** en mL.

### **RESULTAT**

- Déterminer le titre de la liqueur de Fehling.
- Evaluer la quantité de sucres présente dans un litre de moût.



$$V \text{ ml} \equiv 10 \text{ g/l glucose} \rightarrow V' \text{ ml} \equiv x \text{ g/l glucose} \quad 10$$

### Exemple

$$\begin{aligned} V \text{ (glucose } 10\text{g/L)} &= 5,7 \text{ mL} \\ V' \text{ (moût dilué } 1/100) &= 19,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Il faut donc 57 mg de glucose pour réagir avec le réactif de Fehling. Ceci veut dire qu'il y a

- 57 mg de sucres réducteurs dans 19,5 mL du moût dilué
- soit 2,92 g/L dans le moût dilué 1/100 par exemple
- soit 292 g/L dans le moût.

NB : Pour obtenir un résultat significatif, le volume de moût utilisé ne devra pas être inférieur à 3 mL. Dans le cas où la teneur en sucres serait trop importante, faire une dilution pour amener la teneur en sucres à une concentration inférieure à 5 g/L après avoir déterminé approximativement la teneur en sucres par densimétrie.

## 2.3 PH – acidités – acides organiques

### 2.3.1 Mesure du pH (méthode potentiométrique – méthode officielle type I)

#### DEFINITION

Le pH est l'acidité réelle et se définit comme la concentration de protons libres provenant de la dissociation des acides dans une solution.

Sorensen : log inverse  $[H^+]$  en M

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+]$$

#### ETALONNAGE

L'étalonnage du pH mètre s'effectue à 20 °C en suivant les indications données pour l'appareil utilisé avec des solutions tampons de pH 7,00 et 4,00 à 20 °C.

## **METHODE**

Moût : centrifuger à 3000 tours/min pendant 3 minutes

Vin : pas de traitement préalable

- Verser le vin ou le moût dans un bécher
- Plonger l'électrode et lire la valeur du pH. Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon et prendre comme résultat la moyenne des deux mesures.

Le pH du vin ou du moût est exprimé avec 2 décimales.

### **2.3.2 Acidité totale (titrage potentiométrique et avec indicateur)**

#### **DEFINITION**

« L'acidité totale est la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH d'un vin à 7 par addition d'une liqueur alcaline titrée. L'acide carbonique et l'acide sulfureux libre et combiné ne sont pas compris dans l'acidité totale. »

#### **PRINCIPE**

On effectue un titrage potentiométrique ou un titrage en présence de bleu de bromothymol (BBT) comme indicateur de fin de réaction par comparaison à un étalon de coloration.

#### **MODE OPERATOIRE**

CAS DES VINS : DECARBONICATION (élimination du CO<sub>2</sub>)

1. Placer environ 50 mL de vin ou de moût filtré ou centrifugé dans une fiole à vide
2. Boucher la fiole
3. Adapter la trompe à vide à la fiole et ouvrir l'eau
4. Agiter le vin pendant un temps suffisant (2 à 3 minutes)

#### **Titrage potentiométrique – METHODE OFFICIELLE TYPE**

##### ***Étalonnage du pH mètre***

L'étalonnage du pH mètre s'effectue à 20°C en suivant les indications données pour l'appareil utilisé avec la solution tampon de pH 7,00 à 20 °C.

##### ***Technique de mesure***

Dans un bécher, placer 10 mL de vin ou de moût (*pipette jaugée à 2 traits*) décarboniqué. Ajouter 10 mL environ d'eau distillée décarboniquée et verser à la burette la solution 0,1 M de NaOH jusqu'à ce que le pH soit égal à 7 à 20 °C.

L'addition de solution alcaline doit être faite lentement et la solution constamment agitée. Soit n le nombre de millilitres de NaOH 0,1 M versé.

#### **Titrage avec indicateur (bleu de bromothymol) – METHODE NON OFFICIELLE**

Dans un bécher de 300 mL placer :

1. 30 mL d'eau distillée décarboniquée
2. 1 mL de BBT
3. 10 mL (*pipette jaugée à 2 traits*) de vin ou de moût décarboniqué
4. Titrer avec NaOH 0,1N jusqu'au virage bleu vert (= vert canard)

**Soit  $n_{\text{NaOH}}$  mL le volume de NaOH 0,1N versé pour le dosage.**

## CALCULS

L'acidité totale sera exprimée :

- en  $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q}.\text{L}^{-1}$
- en  $\text{g}.\text{L}^{-1}$  d'acide tartrique ( $\text{COOH-CHOH-CHOH-COOH}$ ,  $\text{PM} = 150 \text{ g}.\text{mol}^{-1}$ )
- en  $\text{g}.\text{L}^{-1}$  d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $\text{PM} = 98 \text{ g}.\text{mol}^{-1}$ )

$N_{\text{NaOH}} \times n_{\text{NaOH}} = N_{\text{vin}} \times V_{\text{vin}}$  d'où :

$$\begin{aligned} N_{\text{vin}} &= \frac{N_{\text{NaOH}} \times n_{\text{NaOH}}}{V_{\text{vin}}} \\ &= \frac{0,1 \times n_{\text{NaOH}}}{10} \text{ eq./l} = \frac{0,1 \times n_{\text{NaOH}} \times 1000}{10} \text{ meq./l} = 10 \times n_{\text{NaOH}} \end{aligned}$$

= Acidité totale (meq/l)

$$= \frac{\text{Acidité totale (meq/l)} \times 49}{1000} \text{ g/L H}_2\text{SO}_4$$

$$= \frac{\text{Acidité totale (meq/l)} \times 75}{1000} \text{ g/L H}_2\text{T}$$

### 2.3.3 Dosage de l'acide tartrique méthode rapide colorimétrique

#### PRINCIPE

L'acide tartrique réagit avec l'acide vanadique pour donner une coloration orangée mesurable à 500 nm. Les anthocyanes intervenant par leur couleur, on effectue une deuxième mesure dans les mêmes conditions de pH pour éliminer leur effet.

#### REACTIFS

- Acétate de sodium à 270 g/L en sel anhydre
- Solution A : acide acétique à 30 % (v/v)
- Solution B : dissoudre 10 g de métavanadate (ou monovanadate) d'ammonium dans 150 mL de NaOH 1N. Ajouter 200 mL d'acétate de sodium à 270 g/L. Compléter à 1 litre avec de l'eau.
- Solution 4 : dissoudre 4,5 g de chlorure d'ammonium dans 150 mL de NaOH 1N. Ajouter 200 mL d'acétate de sodium à 270 g/L. Compléter à 1 litre avec de l'eau.

- Solution C : mélanger 1 volume de solution 4 et 1 volume de solution A. Mesurer le pH de ce mélange, soit  $pH_C$ . Il doit être égal au pH du mélange de 1 volume de solution A et 1 volume de solution B. Sinon, ajuster  $pH_C$  avec de la NaOH.
- Solution mère d'acide tartrique à 20 g/Litre.
- Solutions étalon d'acide tartrique à 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 g/L préparées par dilution de la solution mère :

5 mL dans		200 mL
5 "	"	100mL
5 "	"	50 mL
15 "	"	100 mL
10 "	"	50 mL

## MODE OPERATOIRE

Centrifuger le moût à 3000 tours/min

Le vin s'analyse sans traitement au préalable

### *Préparer 3 tubes comme indiqué ci-après*

1 (dosage)	0,5 mL échantillon+ 5 mL de solution A + 5 mL de solution B	<b>V</b>
2 (témoin réactifs)	0,5 mL eau + 5 mL de solution A + 5 mL de solution B	<b>V<sub>0</sub></b>
3 (blanc anthocyanes)	0,5 mL échantillon+ 10 mL de solution C	<b>B</b>

Homogénéiser. Mesurer, après 15 minutes, les absorbances à 500 nm.

Faire un blanc avec de l'eau distillée. V et  $V_0$  sont toujours  $>$  à 1 (même le blanc est très coloré).

$$\text{Absorbance acide tartrique} = (V - V_0) - (B - H_2O)$$

Avec : V	=	absorbance du tube « dosage »
B	=	absorbance du tube « blanc anthocyanes »
$V_0$	=	absorbance du tube « témoin réactifs »
$H_2O$	=	absorbance de l'eau distillée

L'absorbance de l'acide tartrique est rapportée à une courbe étalon fournie afin de calculer la concentration dans l'échantillon. L'équation de la courbe est :

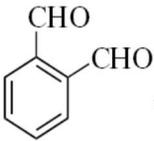
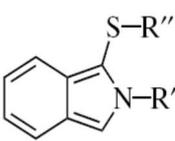
$$\text{Absorbance} = 0,256 \times [\text{acide tartrique g/L}] - 0,0871$$

(Vérifier l'équation en séance de TP)

## 2.4 Dosage de l'azote assimilable

### 2.4.1 Détermination de la teneur en $\alpha$ -aminoacides par méthode NOPA

Les acides  $\alpha$ -aminés sont dérivés par l'o-phthaldialdéhyde (OPA) en présence de N-acétyl cystéine. Les adduits formés sont des isoindoles que l'on détecte et quantifie par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 335 nm.

Compounds	Reagent(s)	Derivative
$R'NH_2$	 , $R''SH$	

$R'NH_2$  : Acide aminé primaire ;  $R''SH$  : N-acétyl cystéine

Avec la méthode NOPA seuls les acides aminés primaires sont dosés, donc pas la proline ni l'azote ammoniacal ( $NH_4^+$ ). Ce dernier est dosé par une méthode enzymatique. La somme du dosage de l'azote ammoniacal et des acides  $\alpha$ -aminés donne un résultat proche de celui du dosage de "l'azote assimilable" obtenu par formol titration avec l'avantage d'éviter l'utilisation du formaldéhyde, qui est un composé corrosif, toxique et mutagène.

### PREPARATION DES REACTIFS

A titre indicatif pour 300 analyses.

Les solutions de réactifs peuvent être conservées jusqu'à 2 semaines à 4°C. Leur utilisation s'effectue à température ambiante.

▪ **Réactif A** : 0,671 g d'OPA sont dissous dans 100 mL d'alcool 95% (v/v). Cette solution est versée dans une fiole jaugée de 1L contenant une solution préparée dans l'eau distillée de NaOH (3,837g), acide borique (8,468g) et N- acétylcystéine (0,816g). Le volume de la fiole est complété ensuite à 1L.

▪ **Réactif B** : préparé à l'identique de la solution A en excluant l'OPA. On verse 100 mL d'alcool dans le mélange NaOH, acide borique et N-acétylcystéine, puis on complète à 1L.

### MODE OPERATOIRE

Préparer les 8 tubes suivant le tableau ci-dessous. Homogénéiser tous les échantillons au vortex.

Tube →	Blanc réactif	Et1	Et2	Et3	Et4	Et5	Blanc Ech	Ech
	Volume à ajouter en µl ( <i>pipette automatique</i> )							
Eau	50	40	30	20	10	-		
Isoleucine 10mM	-	10	20	30	40	50		
Moût							50	50
Réactif A	3000	3000	3000	3000	3000	3000		3000
Réactif B							3000	
Conc Isoelu mM*								
Conc Isoleu mg/L								

Attendre 10 minutes et ensuite lire les absorbances.

Pour l'**étalonnage**, faire le « 0 » avec le « Blanc réactif » et lire l'absorbance des 5 étalons.

Ensuite, refaire le « 0 » avec le « **Blanc Ech** » et lire l'absorbance du moût.

Tracer la droite de calibration de l'isoleucine sous Excel, imprimer, noter l'équation de la droite, le coefficient de corrélation et calculer la concentration en azote aminé primaire :

- en mg/L d'isoleucine
- en mg/L d'azote (N = 14 g/mol ; Isoleu = 131 g/mol)

#### **2.4.2 Détermination de l'azote ammoniacal par méthode enzymatique**

Le cation ammonium constitue, avec les acides aminés, un substrat important pour le métabolisme des levures lors de la fermentation alcoolique. Les teneurs mesurées dans les raisins fluctuent entre quelques mg/L jusqu'à plusieurs centaines de mg/L.

#### **PRINCIPE**

En présence de L- glutamate déshydrogénase et de NADH, l'azote ammoniacal réagit avec l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique pour donner du NAD<sup>+</sup> et du L-glutamate.



La quantité de NADH oxydé en NAD<sup>+</sup> est proportionnelle à la quantité d'azote ammoniacal dans le vin ou le moût. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorption à la longueur d'onde de 340 nm.

#### **MODE OPERATOIRE**

**Au préalable, filtrer le moût et diluer 5 fois.**

Le dosage du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> peut être effectué à partir d'un kit enzymatique (cf protocole p55) dans lequel on trouve 3 flacons dont la composition est la suivante :

- Flacon 1 : Tampon triéthanolamine à pH 8.0, acide  $\alpha$ -céto-glutarique et NADH
- Flacon 2 : Solution de L-glutamate déshydrogénase
- Flacon 3 : Solution contrôle d'azote ammoniacal. La concentration de la solution est notée sur le flacon. Utiliser cette solution sans la diluer.

La réaction enzymatique est déclenchée directement dans la cuve de mesure du spectrophotomètre. Les volumes de réactifs sont mesurés à l'aide de micropipette, et mélangés en suivant le protocole décrit dans le tableau ci-dessous.

- 1- Pipeter les différents volumes dans les cuves appropriées, mélanger et attendre 5 minutes.

• Cuve	• Tampon	• Solution contrôle	• Moût dilué	• Eau distillée
• Blanc	• 0.5 mL	•	•	• 1 mL
• Moût	• 0.5 mL	•	• 0.05 mL	• 0.95 mL
• Contrôle	• 0.5 mL	• 0.05 mL	•	• 0.95 mL

**Attention** : Les micropipettes sont des outils fragiles, évitez de forcer sur les vis et demandez conseil en cas de doute sur leur utilisation. Les solutions sont onéreuses, veillez à bien lire les volumes.

- 2- Mettre le spectrophotomètre à 340 nm, et faire le zéro en utilisant de l'eau distillée, puis mesurer l'absorbance de chaque solution A initial.
- 3- Ajouter 10 µl de L-glutamate déshydrogénase (flacon 2) dans chaque cuve, et mélanger chaque cuve. Laisser incuber 20 minutes. Puis mesurer l'absorbance de chaque solution A finale.

**Remarque** : La réaction est complète au bout de 5 min. Mais si l'absorbance décroît toujours au bout de 20 min, cela peut être dû à une réaction de compétition (RC) avec d'autres réactions consommatrices de NADH. Refaire la mesure toutes les minutes jusqu'à stabilisation de la DO. Calculer alors le taux de diminution dû à la réaction compétitive  $\Delta A_{340} RC$ . Penser à soustraire cette valeur lors du calcul de la concentration en ammonium,  $\Delta A_{340} test - \Delta A_{340} RC$ .

## CALCUL

Déterminer :

- le  $\Delta A_{340}$  pour le blanc, le moût et le contrôle. Pour chacun,  $\Delta A_{340} = A_{initiale} - A_{finale}$
- $\Delta(\Delta A_{340})$  moût et contrôle =  $\Delta A_{340}(\text{moût ou contrôle}) - \Delta A_{340}(\text{Blanc})$
- La concentration en azote ammoniacal en mg/mL de moût et dans le contrôle, puis donner la concentration en mg/L d'azote ( $N=14 \text{ g/mol}$  ; azote ammoniacal =  $17 \text{ g/mol}$ )

$$= \frac{(A) (TV) (MW \text{ NH}_4^+) (F)}{(\epsilon) (d) (SV) (CF)}$$

$A = \Delta(\Delta A_{340})$  Moût ou contrôle

TV = volume total d'essai en mL

SV = volume de prise d'échantillon en mL

MW de  $\text{NH}_4^+ = 17 \text{ g/mol}$

F = facteur de dilution de la préparation de l'échantillon

$\varepsilon$  = coefficient d'extinction moléculaire du NADH à 340 nm =  $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d = trajet optique = 1 cm

CF = facteur de conversion (1000)

### **DETERMINATION DE L'AZOTE ASSIMILABLE**

Utiliser les résultats obtenus dans les parties 2.4.1 et 2.4.2 pour calculer l'azote assimilable (exprimé en mg N/L) de votre moût.

Commenter le résultat du point de vue de la fermentescibilité du moût.

# Ammonia



BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM  
Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis

## UV-method

for the determination of ammonia in foodstuffs and other materials and for the determination of nitrogen after Kjeldahl-digestion (see pt. 12.2)

**Cat. No. 11 112 732 035**

Test-Combination for approx. 50 determinations

For use in *in vitro* only

Store at 2-8°C

For recommendations for methods and standardized procedures see references (2)

### Principle (Ref. 1)

In the presence of glutamate dehydrogenase (GIDH) and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH), ammonia reacts with 2-oxoglutarate to L-glutamate, whereby NADH is oxidized.



The amount of NADH oxidized in the above reaction is stoichiometric to the amount of ammonia. NADH is determined by means of its light absorbance at 334, 340 or 365 nm.

### The Test-Combination contains

1. Bottle 1 with approx. 60 ml solution, consisting of: triethanolamine buffer, pH approx. 8.0; 2-oxoglutarate, 150 mg
2. Bottle 2 with approx. 50 tablets; each tablet contains: NADH, approx. 0.4 mg
3. Bottle 3 with approx. 1.2 ml glutamate dehydrogenase solution, approx. 1000 U
4. Bottle 4 with ammonia assay control solution for assay control purposes (measurement of the assay control solution is not necessary for calculating the results.) Use the assay control solution undiluted. (Expiry date: see pack label)

### Preparation of solutions

1. Use contents of bottle 1 undiluted.
2. Dissolve **one tablet** of bottle 2 with **one ml** solution of bottle 1 in a beaker or in a reagent tube for each assay (blank and samples) depending on the number of determinations. Use forceps for taking the tablets out of bottle 2. This results in reaction mixture 2\*.
3. Use contents of bottle 3 undiluted.

### Stability of reagents

Solution 1 is stable at 2-8°C (see pack label).  
Bring solution 1 to 20-25°C before use.  
Tablets 2 are stable at 2-8°C (see pack label).  
Reaction mixture 2 is stable for 3 days at 2-8°C.  
Bring reaction mixture 2 to 20-25°C before use.  
The contents of bottle 3 are stable at 2-8°C (see pack label).

### Procedure

Wavelength<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm  
Glass cuvette<sup>2</sup>: 1.00 cm light path  
Temperature: 20-25°C  
Final volume: 3.020 ml

Read against air without a cuvette in the light path) or against water  
Sample solution: 0.2-8 µg ammonia/assay<sup>3</sup> (in 0.100-2.000 ml sample volume)

Pipette into cuvettes	Blank	Sample
reaction mixture 2*	1.000 ml	1.000 ml
sample solution**	-	0.100 ml
redist. water	2.000 ml	1.900 ml
Mix***, and read absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ) after approx. 5 min at 20-25°C. Start reaction by addition of:		
solution 3	0.020 ml	0.020 ml
Mix***, wait for completion of the reaction (approx. 20 min) and read absorbances of the solutions (A <sub>2</sub> ). If the reaction has not stopped after 20 min, continue to read absorbances in 2 min intervals until the absorbances increase constantly over 2 min.		

\* For simplification of the assay performance it is also possible to pipette directly 1.000 ml of solution 1 into the cuvette and add 1 tablet from bottle 2. After dissolution of the tablet with the aid of a spatula continue working as described in the procedure. The difference in volume of ca. 1% (increase of volume by 1 tablet per 3.020 ml assay volume) has to be taken into account in the calculation by multiplication of the result with 1.01.

\*\* Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.

\*\*\* For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm (trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct, USA)

If the absorbance A<sub>2</sub> decreases constantly, extrapolate the absorbance to the time of the addition of solution 3 (GIDH).

Determine the absorbance differences (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) for both, blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{sample}} - (A_1 - A_2)_{\text{blank}}$$

The measured absorbance differences should, as a rule, be at least 0.100 absorbance units to achieve sufficiently precise results (see "Instructions for performance of assay" and "Sensitivity and detection limit", pt. 4).

If the absorbance differences of the samples (ΔA<sub>sample</sub>) are higher than 1.000 (measured at 340 nm or Hg 334 nm respectively) or 0.500 (measured at 365 nm), the concentration of ammonia in the sample solution is too high. The sample is to be diluted according to the dilution table in that case.

### Calculation

According to the general equation for calculating the concentration:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ε = extinction coefficient of NADH at:

$$340 \text{ nm} = 6.3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3.4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6.18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

It follows for ammonia:

$$c = \frac{3.020 \times 17.03}{\epsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{0.5143}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g ammonia/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted on preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{Content}_{\text{ammonia}} = \frac{c_{\text{ammonia}} \text{ [g/l sample solution]}}{\text{weight}_{\text{sample}} \text{ ln g/l sample solution}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

### 1. Instructions for performance of assay

The amount of ammonia present in the assay has to be between 0.2 µg and 8 µg. In order to get a sufficient absorbance difference, the sample solution is diluted to yield an ammonia concentration between 0.01 and 0.08 g/l.

### Dilution table

Estimated amount of ammonia per liter	Dilution with water	Dilution factor F
< 0.08 g	-	1
0.08-0.8 g	1 + 9	10
0.8-8.0 g	1 + 99	100

If the measured absorbance difference (ΔA) is too low (e.g. < 0.100), the sample solution should be prepared again (weigh out more sample or dilute less strongly) or the sample volume to be pipetted into the cuvette can be increased up to 2.000 ml. The volume of water added must then be reduced to obtain the same final volume in the assays for sample and blank. The new sample volume v must be taken into account in the calculation.

1 The absorption maximum of NADH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; if spectralline photometers equipped with a mercury vapor lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.

2 If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.

3 See instructions for performance of assay

## 2. Technical information

- 2.1 Use only freshly distilled water for the assay.
- 2.2 Work in an atmosphere free from ammonia (ban smoking in the laboratory).

## 3. Specificity (Ref. 1)

The method is specific for ammonia.

In the analysis of commercial ammonium sulfate results of approx. 100% have to be expected.

## 4. Sensitivity and detection limit (Ref. 1.2)

The smallest differentiating absorbance for the procedure is 0.005 absorbance units. This corresponds to a maximum sample volume  $v = 2.000$  ml and measurement at 340 of an ammonia concentration of 0.02 mg/l sample solution (if  $v = 0.100$  ml, this corresponds to 0.4 mg/l sample solution).

The detection limit of 0.08 mg/l is derived from the absorbance difference of 0.020 (as measured at 340 nm) and a maximum sample volume  $v = 2.000$  ml.

## 5. Linearity

Linearity of the determination exists from approx. 0.2  $\mu\text{g}$  ammonia/assay (0.08 mg ammonia/l sample solution; sample volume  $v = 2.000$  ml) to 8  $\mu\text{g}$  ammonia/assay (0.08 g ammonia/l sample solution; sample volume  $v = 0.100$  ml).

## 6. Precision

In a double determination using one sample solution, a difference of 0.005 to 0.010 absorbance units may occur. With a sample volume of  $v = 0.100$  ml and measurement at 340 nm, this corresponds to an ammonia concentration of approx. 0.4-0.8 mg/l. (If the sample is diluted during sample preparation, the result has to be multiplied by the dilution factor F. If the sample is weighed in for sample preparation, e.g. using 1 g sample/100 ml = 10 g/l, a difference of 0.004-0.01 g/100 g can be expected.)

The following data have been published in the literature:

CV = 1.6 %	(plasma)	(Ref. 1.1)
CV = 0.88-1.16 %	(ammonium chloride solutions)	(Ref. 1.2)
CV = 0.34 %	(ammonium chloride solution)	
CV = 0.36-0.96 %	(meat samples)	(Ref. 3.2)

## 7. Interference/sources of error

During protein precipitation with perchloric acid which is to be carried out in foodstuffs protein fragments are occasionally obtained. These protein fragments are kept in solution and may gradually form ammonia in alkaline buffer systems leading to creep reactions. This formation of ammonia is very low and can be differentiated and calculated from the ammonia content of the sample by extrapolation of the absorbance  $A_2$  to the time of the addition of solution 3 (GIDH).

The common ingredients of foodstuffs do not interfere with the determination of ammonia. Only high concentrations of tannins in fruit juices may cause an inhibitor of the GIDH reaction. Fruit juices should therefore always be treated with PVPP.

As high concentrations of heavy metals cause turbidity, they also make a reliable determination of ammonia difficult. In most cases high concentrations of metal ions can be removed as hydroxides by alkalization of the sample solution (pH > 7.5).

Sodium thiosulfate, occasionally added to samples of swimming-pool water, does not interfere with the assay up to 1 mg per assay.

## 8. Recognizing interference during the assay procedure

- 8.1 If the conversion of ammonia has been completed according to the time given under "Procedure", it can be concluded in general that no interference has occurred.
- 8.2 On completion of the reaction, the determination can be restarted by adding ammonia (ammonium chloride, ammonium sulfate; qualitative or quantitative): if the absorbance is altered subsequent to the addition of the standard material, this is also an indication that no interference has occurred.
- 8.3 Operator error or interference of the determination through the presence of substances contained in the sample can be recognized by carrying out a double determination using two different sample volumes (e.g. 0.100 ml and 0.200 ml): the measured differences in absorbance should be proportional to the sample volumes used.

When analyzing solid samples, it is recommended that different quantities (e.g. 1 g and 2 g) be weighed into 100 ml volumetric flasks.

The absorbance differences measured and the weights of sample used should be proportional for identical sample volumes.

- 8.4 Possible interference caused by substances contained in the sample can be recognized by using an internal standard as a control: in addition to the sample, blank and standard determinations, a further determination should be carried out with sample and assay control solution in the same assay. The recovery can then be calculated from the absorbance differences measured.
- 8.5 Possible losses during the determination can be recognized by carrying out recovery tests: the sample should be prepared and analyzed with and without added standard material. The additive should be recovered quantitatively within the error range of the method.

## 9. Reagent hazard

The reagents used in the determination of ammonia are not hazardous materials in the sense of the Hazardous Substances Regulations, the Chemicals Law or EC Regulation 67/548/EEC and subsequent alteration, supplementation and adaptation guidelines. However, the general safety measures that apply to all chemical substances should be adhered to.

After use, the reagents can be disposed of with laboratory waste, but local regulations must always be observed. Packaging material can be disposed of in waste destined for recycling.

## 10. General information on sample preparation

In carrying out the assay:

Use **clear, colorless and practically neutral liquid samples** directly, or after dilution according to the dilution table, and of a volume up to 2.000 ml; Filter **turbid solutions**;

Degass **samples containing carbon dioxide** (e.g. by filtration);

Adjust **acid samples** to pH 7-8 by adding sodium or potassium hydroxide solution;

Adjust **acid and weakly colored samples** to pH 7-8 by adding sodium or potassium hydroxide solution and incubate for approx. 15 min;

Treat **"strongly colored" samples** that are used undiluted or with a higher sample volume with polyvinylpyrrolidone (PVPP) - (e.g. 2.5-5 g/100 ml);

Crush or homogenize **solid or semi-solid samples**, extract with water or dissolve in water and filter if necessary;

Deproteinize **samples containing protein** with perchloric acid or with trichloroacetic acid;

Extract **samples containing fat** with hot water (extraction temperature should be above the melting point of the fat involved). Cool to allow the fat to separate, make up to the mark, place the volumetric flask in an ice bath for 15 min and filter;

Break **emulsions** with trichloroacetic acid.

## Important note

**The Carrez-clarification should not be used in the sample preparation for ammonia determination due to a too low recovery rate (adsorption of ammonia).**

## 11. Application examples

### Determination of ammonia in fruit juices

Add 0.5-1.0 g (!) wet polyvinylpyrrolidone (PVPP) to 10 ml fruit juice (clear, turbid or colored juices) - when the sample volume is increased, neutralize, if necessary, and fill up to 20 ml with water - in a beaker and stir for 1 min (magnetic stirrer). Filter sample solution immediately and use it for the assay.

### Determination of ammonia in water (swimming-pool water) (Ref. 3.1, 3.4)

Filter the water sample if necessary, and use the clear sample for the assay. Dilute sample solution according to the dilution table or use up to  $v = 2.000$  ml sample volume for the assay.

### Determination of ammonia in milk

Mix 1 ml milk with 4 ml trichloroacetic acid (0.3 M). After approx. 5 min centrifuge for separation of the precipitate. Decant the supernatant and neutralize with KOH (10 M) (dilution factor can be neglected due to the high concentration of KOH), filter and use 1.000-2.000 ml sample solution for the assay.

### Determination of ammonia in bakery products

Accurately weigh approx. 10 g of the minced sample into a homogenizer beaker, add approx. 20 ml perchloric acid (1 M) and homogenize for approx. 2 min. Proceed as stated under "meat and meat products". Use at most 1.000 ml for the assay.

### Determination of ammonia in meat, meat products (Ref. 3.2, 3.3) and cheese

Accurately weigh approx. 5 g of the homogenized sample (from a sample of 100 g, that has been ground and homogeneously mixed in a mixer) into a homogenizer beaker, add approx. 20 ml perchloric acid (1 M) and homogenize for approx. 2 min. Transfer the contents quantitatively with approx. 40 ml water into a beaker. Adjust to pH 7.0 (< 7.5) first with potassium hydroxide (5 M) and then exactly with potassium hydroxide (2 M). Transfer the contents quantitatively with water into a 100 ml volumetric flask, fill up to the mark with water, whereby it must be taken care that the fatty layer is above the mark and the aqueous layer is at the mark.

For separation of fat and for precipitation of the potassium perchlorate refrigerate for 20 min. Afterwards filter. Discard the first few ml. Use the clear, possibly slightly turbid solution for the assay, if necessary after dilution acc. to the dilution table.

Calculate the amount of ammonia according to the afore mentioned calculation formula, whereby it must be multiplied with the volume displacement factor  $K = 0.98$ .

### Determination of ammonia in licorice products, sal ammoniac pastilles

Accurately weigh out approx. 1 g minced and homogenized sample into a 100 ml volumetric flask, add about 60 ml water of 60 to 70°C and stir with a magnetic stirrer about 10 min till the material is completely dissolved. Adjust to 20-25°C, fill up with water to the mark, mix and filter.

Discard the first ml, use the (almost) clear filtrate for the assay, after dilution according to the dilution table if necessary.

## 12. Further applications

The method may also be used in the examination of fertilizers, pharmaceuticals, cosmetics, paper (Ref. 2.1) and in research when analyzing biological samples. For details of sampling, treatment and stability of the sample see Ref. 1.1-1.2.

### Examples:

#### 12.1 Determination of ammonia in fertilizers

Grind approx. 10 g of the sample and mix thoroughly. Accurately weigh approx. 100 mg of the homogeneous material into a 100 ml beaker and add approx. 50 to 60 ml water. Adjust to pH 7-8 with diluted hydrochloric acid (1 M) or in the case of acidic fertilizer with diluted sodium hydroxide (1 M). Warm to 60-70°C on a heatable magnetic stirrer for approx. 10 min. Allow to cool, transfer quantitatively into a 100 ml volumetric flask and fill up to the mark with water. Mix the solution and filter, if necessary.

Use 0.100 ml of the clear solution diluted, if necessary, for the assay.

#### 12.2 Determination of nitrogen after Kjeldahl-digestion

The determination of total nitrogen can be obtained via the ammonia determination in a sample mineralized according to the Kjeldahl-method. Normally, the samples are to be incinerated wet (sulfuric acid). The ammonia, formed from nitrogen, is determined according to the procedure as follows:

Accurately weigh approx. 2 g of the ground and homogenized sample into a 100 ml Kjeldahl-flask, add 20 ml sulfuric acid (specific gravity = 1.84 g/ml) and approx. 30 mg catalyst mixture (e.g. acc. to Wieninger) or one Kjeldahl-tablet, heat for approx. 2-3 h until the sample is disintegrated (yellowish or blue-greenish solution). Allow the sample to cool and carefully (protective glasses), transfer the material quantitatively into a beaker filled with 600 ml ice-cold water, stirring all the time (magnetic stirrer, icebath). Neutralize with approx. 60 ml KOH (10 M) (pH 6-8). Transfer the neutralized solution quantitatively into a 1 l volumetric flask, fill up to the mark with water and mix. If necessary, filter the mixture (sometimes necessary after disintegration with Kjeldahl-tablets); discard the first few ml. Use the solution diluted, if necessary, for the assay.

#### Calculation:

Nitrogen content of the sample (in %) =

$$\begin{aligned} &= \frac{\Delta A \times V \times MW \times 100}{\epsilon \times d \times v \times 1000 \times \text{amount weighed [g]}} = \\ &= \frac{\Delta A \times 3.020 \times 14.01 \times 100}{\epsilon \times 1000 \times 0.100 \times 1000 \times \text{amount weighed [g]}} \end{aligned}$$

### 12.3 Determination of ammonia in fermentation samples and cell culture media

Place the sample (after centrifugation, if necessary) in a water-bath at 80°C for 15 min to stop enzymatic reactions. Centrifuge and use the supernatant (diluted according to the dilution table, if necessary) for the assay. Alternatively, deproteinization can be carried out with perchloric acid. See the above-mentioned examples.

Homogenize gelatinous agar media with water and treat further as described.

## References

1. da Fonseca-Wollheim, F., Bergmeyer, H. U. & Gutmann, I. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U. Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1850-1853, Verlag Chemie, Weinheim and (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U. ed.) 2nd ed., vol. 4, pp. 1802-1806, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
2. Bergmeyer, H. U. & Beutler, H.-O. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VIII, pp. 454-461, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappen für die Lebensmittelverpackungen (gem. Empfehlungen XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden) Pkt. 3.4.2 (Ammoniak)
- 2.2 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 597-599 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 3.1 Höpner, Th. (1977) Enzymatische Methoden in der Wasseranalytik - Möglichkeiten und Grenzen, Vom Wasser 49, 173-182
- 3.2 Gerhardt, U. & Quang, T. D. (1979) Methoden zur Ammoniakbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Fleischwirtschaft 59, 946-948
- 3.3 Barchietto, G., Cantoni, C., Frigerio, R. & Provera, D. (1984) Esame comparativo dei prodotti di autolisi nella carne di maiale (Azoto non proteico, Urea, Ammoniaca), Conservazione degli Alimenti 3, 12-17
- 3.4 Bartels, U. (1991) Die enzymatische Bestimmung von Ammonium im Niederschlagswasser, CLB Chemie in Labor und Biotechnik 42, 377-382
- 3.5 Cheuk W. L. & Finne, G. (1984) Enzymatic determination of urea and ammonia in refrigerated seafood products, J.Agric.Food Chem. 32, 14-18

# Ammonia assay control solution (Bottle 4)

**Concentration:** see bottle label

Ammonia assay control solution is a stabilized aqueous solution of ammonia. It serves as an assay control solution for the enzymatic determination of ammonia in foodstuffs and other materials.

**Application:**

1. *Addition of ammonia assay control solution to the assay mixture:*  
Instead of sample solution the assay control solution is used for the assay.

2. *Restart of the reaction, quantitatively:*

After completion of the reaction with sample solution and measuring of  $A_2$ , add 0.050 ml assay control solution to the assay mixture. Read absorbance  $A_3$  after the end of the reaction (approx. 20 min). Calculate the concentration from the difference of ( $A_2 - A_3$ ) according to the general equation for calculating the concentration. The altered total volume must be taken into account. Because of the dilution of the assay mixture by addition of the assay control solution, the result differs insignificantly from the data stated on the bottle label.

3. *Internal standard:*

The assay control solution can be used as an internal standard in order to check the determination for correct performance (gross errors) and to see whether the sample solution is free from interfering substances:

Pipette into cuvettes	Blank	Sample	Standard	Sample + Standard
reaction mixture 2	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
sample solution	-	0.100 ml	-	0.050 ml
assay control sln.	-	-	0.100 ml	0.050 ml
redist. water	2.000 ml	1.900 ml	1.900 ml	1.900 ml

Mix, and read absorbances of the solutions ( $A_1$ ) after approx. 5 min. Continue as described in the pipetting scheme under "Procedure". Follow the instructions given under "Instructions for performance of assay" and the footnotes.

The recovery of the standard is calculated according to the following formula:

$$\text{recovery} = \frac{2 \times \Delta A_{\text{sample + standard}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times 100 [\%]$$

## 2.5 Turbidité : Mesure par Néphélométrie

La turbidité correspond à la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matières non dissoutes.

**L'unité de turbidité utilisée est le NTU (Nephelometric Turbidity Unit ou unité de turbidité néphélométrique) qui correspond à la mesure de la lumière diffusée par une suspension étalon de formazine sous un angle de 90° par rapport à la direction du faisceau incident.**

Expression des résultats :

L'indice de turbidité du vin ou du moût examiné est exprimé en NTU :

- si la turbidité est inférieure à 1 NTU, arrondir à 0,01 NTU
- si la turbidité est entre 1 et 10 NTU, arrondir à 0,1 NTU
- si la turbidité est entre 10 et 100 NTU, arrondir à 1 NTU

La turbidité des moûts varie de 10 NTU (très limpide) à 2000-4000 (très bourbeux)..

Pour les vins finis, le tableau ci-dessous donne la correspondance entre la turbidité des vins finis et leur appréciation visuelle.

Vins finis	Blanc	Rosé	Rouge
Limpide	< 1,1 NTU	< 1,2 NTU	< 2 NTU
Clair à voilé	1,1 < < 4,4	1,2 < < 4,8	2 < < 8
Trouble	> 4,4 NTU	> 4,8 NTU	> 8 NTU



## SECTION 3 ANALYSE DES VINS BLANCS

---

---

### 3.1 Acides et acidité

#### 3.1.1 Acidité totale (titrage potentiométrique et avec indicateur)

##### DEFINITION

« L'acidité totale est la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH d'un vin à 7 par addition d'une liqueur alcaline titrée. Le dioxyde de carbone n'est pas compris dans l'acidité totale ».

##### PRINCIPE

Titration potentiométrique ou titration en présence de bleu de bromothymol (BBT) comme indicateur de fin de réaction par comparaison à un étalon de coloration ou par pH-mètre.

##### MODE OPERATOIRE

###### *Décarbonation*

1. Placer **environ** 50 mL de vin dans une fiole à vide ;
2. Boucher la fiole ;
3. Adapter la trompe à vide à la fiole et ouvrir l'eau ;
4. Agiter la fiole environ 2 - 3 minutes

###### *Titration potentiométrique – (méthode officielle type I)*

L'étalonnage du pH mètre s'effectue à 20 °C en suivant les indications données pour l'appareil utilisé avec la solution tampon de pH 7,00 à 20 °C.

1. Dans un vase cylindrique (bêcher) placer 10 mL de vin décarboniquée ;
2. Ajouter 10 mL environ d'eau distillée décarboniquée et verser à la burette la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium jusqu'à ce que le pH soit égal à 7 à 20 °C. L'addition de solution alcaline doit être faite lentement et la solution constamment agitée ;
3. Soit  $n_{\text{NaOH}}$  mL le volume de NaOH 0,1N versé pour le dosage (environ 6 mL)

**Calculer l'acidité totale en méq/l et en g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

###### *Titration avec indicateur BBT (méthode officielle type I)*

Dans un bécher de 300 mL placer :

1. 30 mL d'eau distillée décarboniquée
2. 1 mL de BBT
3. 10 mL du vin décarboniquée
4. Titrer avec NaOH 0,1N jusqu'au virage bleu-vert (= vert canard)
5. Soit  $n_{\text{NaOH}}$  mL le volume de NaOH 0,1N versé pour le dosage (environ 6 mL)

**Calculer l'acidité totale en méq/l et en g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

### 3.1.2 Acidité volatile par entraînement et rectification des vapeurs

#### INTRODUCTION

L'acidité volatile est constituée par la partie des acides gras appartenant à la série acétique qui se trouvent dans les vins soit à l'état libre, soit à l'état salifié. L'acidité volatile est un test de la santé du vin. La concentration initiale est moins importante que son évolution avec le temps : si la concentration augmente en fonction du temps, cela indique que le vin n'est pas stable biologiquement et qu'il y a des bactéries acétiques qui oxydent l'alcool en acide acétique.

L'acidité volatile ne doit pas comptabiliser le CO<sub>2</sub>, le SO<sub>2</sub>, l'acide sorbique (Ac. Sor.), l'acide lactique qui a une légère volatilité, et l'acide salicylique (Ac. Sal.) ou sodium salicylate (Na Sal.). Les deux derniers sont ajoutés par les analystes après un prélèvement du vin afin de le stabiliser avant l'analyse elle-même.

L'acidité totale peut être exprimée en :

- méq/L
- mg/L d'acide acétique où le taux, en méq/l, est multiplié par 60 g/eq.
- mg/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> où le taux, en méq/l, est multiplié par 49 g/eq. (1 eq. de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = Masse Molaire de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ÷ 2 en acidimétrie).

#### PRINCIPE

La séparation des acides volatils est faite par entraînement à la vapeur d'eau et rectification des vapeurs. Les composés les plus responsables de l'acidité volatile (c'est à dire l'acide acétique) n'étant pas aussi volatil que l'éthanol, il ne serait pas complètement récupéré par la distillation directe. Il a été empiriquement calculé à partir de d'une prise d'essai de 20 mL d'acide acétique qu'il faudrait 250 mL du distillat pour récupérer 100 % de l'acide. Par contre, un rendement de 100 % n'est réalisable qu'avec de l'entraînement à la vapeur. Le principe est que le vapeur d'eau (exempte de CO<sub>2</sub> par stockage en lait de chaux) est barbotée dans un échantillon du vin où elle entraîne les composés volatils. La vapeur est ensuite condensée dans une colonne réfrigérante et récupérée dans un flacon conique de 500 mL.

Le CO<sub>2</sub> est préalablement éliminé par agitation sous vide (environ 3 minutes pour un vin tranquille). L'acide lactique est éliminé pendant l'entraînement car, grâce à la colonne rectificatrice dans l'appareillage, ce composé légèrement volatil ne peut pas être entraîné par encombrements de la colonne : ainsi, il n'apparaît pas dans le distillat.

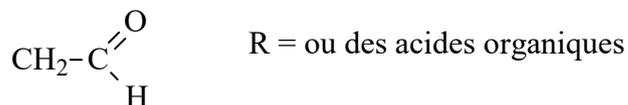
Avant de barboter l'échantillon, environ 200 mg d'acide tartrique sont ajoutés à l'échantillon afin de baisser le pH : en effet, au pH du vin (pH ≈ 3,5), l'acide acétique (pKa = 4,35) serait en partie ionisé (10 % de forme ionisée pour 90 % de forme acide). Etant donné que c'est uniquement sous sa forme la forme acide (non-ionisée) que ce composé est volatil, il est nécessaire d'abaisser le pH pour avoir 100 % de forme acide entraînable à la vapeur.

L'acidité brute est dosée par une solution 0,1 N de NaOH en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur (le pH au point d'équivalence est dans la région de 8,8 et le point de virage de la phénolphtaléine est 9,4). **NB : virage incolore au rose.** Le SO<sub>2</sub> libre est ensuite dosé par titration en oxydo-réduction. L'iode à 0,01 N est utilisé pour oxyder le SO<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en

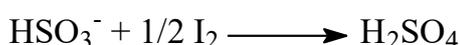
présence d'iodure de potassium (KI) et d'empois d'amidon comme indicateur. Avant d'effectuer le dosage, une goutte d'acide chlorhydrique (HCl pur) est ajoutée pour ramener le pH dans la zone acide.



Ensuite, une hydrolyse alcaline est effectuée par l'ajout d'environ 20 mL d'une solution saturée de borax (borate de sodium) afin de libérer le  $\text{SO}_2$  combiné sous forme de  $\text{RHSO}_3^-$ , où



Le  $\text{HSO}_3^-$  ainsi libéré est titré avec de l'iode 0,01 N suivant la réaction :



*NB* : Comme le borate rend la solution alcaline (coloration rose), **le virage est au rose - violet dû au bleu du complexe iode-amidon**

## APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un générateur de vapeur d'eau, d'un barboteur dans lequel on place le vin, d'une colonne rectificatrice et d'un réfrigérant. Les conditions minimales que doit remplir tout appareil ou toute technique permettant de doser avec exactitude l'acidité volatile telle qu'elle a été définie, sont les suivantes :

La **vapeur d'eau** produite par le générateur doit être suffisamment exempte de gaz carbonique pour que 250 mL de distillat additionnés de 0,1 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium N/10 et de deux gouttes de phénolphaléine à 1 % présentent une coloration stable pendant au moins 10 secondes.

Dans les conditions habituelles d'emploi, les **99,5 % de l'acide acétique** en solution aqueuse placé dans le barboteur à la place du vin doivent se retrouver dans le distillat.

Si l'on place une solution 1 N **d'acide lactique** pur à la place du vin dans le barboteur, 5 % au plus de cet acide doivent se retrouver dans le distillat obtenu dans les conditions qui permettent la distillation des 99,5 % de l'acide acétique.

Tout appareil ou toute technique qui satisfait à ces trois essais successifs constitue un appareil ou une technique officielle.

## MODE OPERATOIRE

Comme pour l'acidité totale il est nécessaire de **décarboniquer** l'échantillon.

### ENTRAINEMENT A LA VAPEUR ET DOSAGE

Le générateur de vapeur est alimenté par de l'eau de chaux ou de l'eau de baryte limpide.

Dans le ballon de l'appareil verser :

1. 20 mL de vin décarboniqué ;
2. Un cristal d'acide tartrique (0,2 g environ) ;

3. Boucher le ballon ;
4. Recueillir ~ 300 mL de distillat dans un erlenmeyer (fiolle conique) de 500 mL ;
5. Doser immédiatement (ou bien boucher) ;
6. Ajouter 1 goutte de phénolphaléine et titrer par NaOH 0,1 N.

**Soit  $n_{\text{NaOH}}$  mL le volume de NaOH 0,1 N versé**

7. Rajouter :

- 1 goutte d'HCl pur (**NE PAS EN METTRE EN EXCES**) ;
- 1 mL empois amidon ;
- Quelques cristaux d'iodure de potassium ;
- Titrer par  $\text{I}_2$  0,01 N.

**Soit  $n''\text{I}_2$  mL le volume de  $\text{I}_2$  0,01 N versé**

8. Rajouter 20 mL de Borax à l'éprouvette et remuer ;

9. Titrer par  $\text{I}_2$  0,01 N

**Soit  $n'''\text{I}_2$  mL le volume de  $\text{I}_2$  0,01 N**

#### *CALCUL*

La NaOH neutralise toute l'acidité volatile mais aussi le  $\text{SO}_2$  dans le distillat avec une chute de burette de  $n_{\text{NaOH}}$  mL. Le volume d'iode 0,01 N utilisé pour l'oxydation du  $\text{SO}_2$  libre est  $n''\text{I}_2$  mL et le volume pour oxyder le  $\text{SO}_2$  combiné est  $n'''\text{I}_2$  mL.

Afin d'effectuer le calcul, tous les volumes sont rapportés au NaOH. Dans ce cas, l'acidité volatile diminuée de la contribution du  $\text{SO}_2$  est :

**Acidité volatile méq/L = acidité brute - ( $\text{SO}_2$  libre &  $\text{SO}_2$  combiné)**

**Calculer l'acidité volatile en méq/L, mg/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et mg/L  $\text{CH}_3\text{COOH}$**   
(Arrondir 2 chiffres après la virgule)

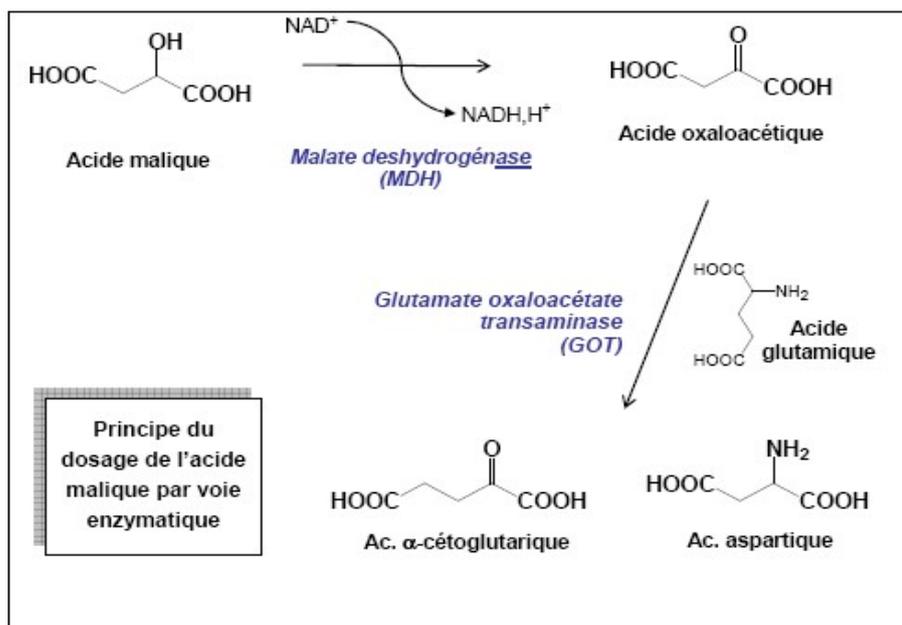
### **3.1.3 Dosage d'acide malique par méthode enzymatique**

#### **INTRODUCTION**

L'acide malique du raisin et du vin est l'isomère L(-) ; il est biologiquement instable. Sa teneur diminue au cours de la fermentation alcoolique et devient nulle après la fermentation malolactique.

#### **PRINCIPE (VOIR SCHEMA)**

L'acide malique est oxydé en acide oxaloacétique. L'enzyme qui catalyse cette réaction est la malate deshydrogénase (MDH) dont le coenzyme est le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). L'équilibre de cette réaction est en faveur de l'acide malique. Pour le déplacer et afin de rendre le dosage possible, l'acide oxaloacétique est éliminé au fur et à mesure de sa formation. On utilise pour cela la réaction de transamination avec l'acide glutamique catalysée par le glutamate oxaloacétate transaminase (GOT). Pour suivre le dosage, on suit l'augmentation de l'absorbance du mélange à 340 nm provoquée par la formation de NADH.



## MODE OPERATOIRE

Le dosage est effectué **SUR VIN DILUE 1 SUR 10** à partir d'un kit dans lequel on trouve 4 solutions préparées dont la composition est :

- Solution 1 : Tampon glycylglycine 0,6 M pH 10,0 + acide glutamique 0,1 M
- Solution 2 : NAD 210 mg de lyophilisat dissout dans 6 mL d'eau distillée
- Solution 3 : G.O.T. 0,4 mL correspondant à 160 U
- Solution 4 : M.D.H. 0,4 mL correspondant à 2400 U

La réaction enzymatique est déclenchée directement dans la cuve de mesure du spectrophotomètre. Les volumes de réactifs sont mesurés avec une pipette automatique, et mélangés en suivant le protocole décrit dans le tableau ci-dessous. Effectuer le « témoin » et « dosage » en parallèle.

Pipeter dans les cuves (µL)	Témoin	Dosage
Solution 1 (tampon)	500	500
Solution 2 (N.A.D.)	100	100
Échantillon	0	50
Eau distillée	500	450
Solution 3 (G.O.T.)	5	5
<b>Mélanger et après 3 minutes lire A<sub>1</sub> témoin et A<sub>1</sub> échantillon,</b>		
Démarrer la réaction par addition de :		
Solution 4 (M.D.H.)	5	5
<b>Mélanger et après 10 minutes lire A<sub>2</sub> témoin et A<sub>2</sub> échantillon</b>		

## CALCUL

Déterminer la différence d'absorbance ( $\Delta A = A_2 - A_1$ ) pour le témoin et pour le dosage.

Soustraire la  $\Delta A$  du témoin de celle du dosage (soit  $\Delta A_{\text{dosage}} - \Delta A_{\text{témoin}}$ ) afin d'obtenir  $\Delta A_{\text{acide L-malique}}$ . Cette valeur doit, en règle générale, être d'au moins 0,100 unités d'absorbance pour obtenir des résultats d'une précision suffisante.

La concentration en acide malique est ensuite donnée par :

$$C = \frac{V \times MM \times \Delta A \text{ Acide malique}}{\epsilon \times l \times V}$$

Où

V	= volume final [mL]
MM	= masse moléculaire de l'acide L-malique [g/mol]
$\epsilon$	= coefficient d'extinction du NADH à 340 nm = 6300 [ $l \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ]
l	= trajet optique [cm]
v	= volume de l'échantillon [mL]

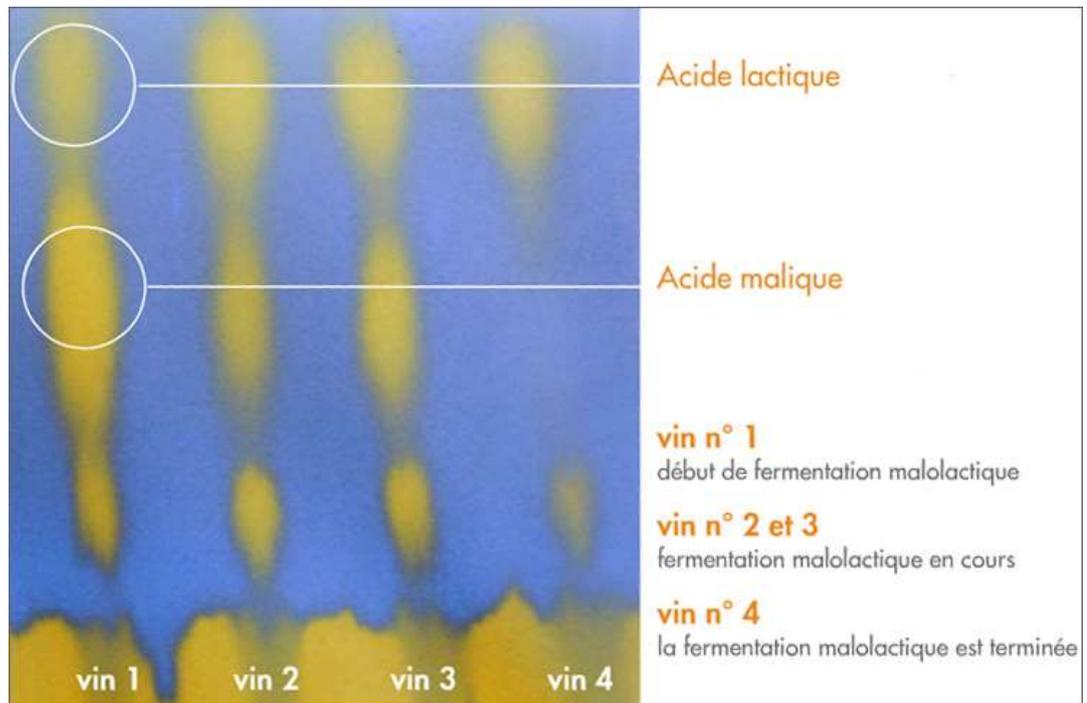
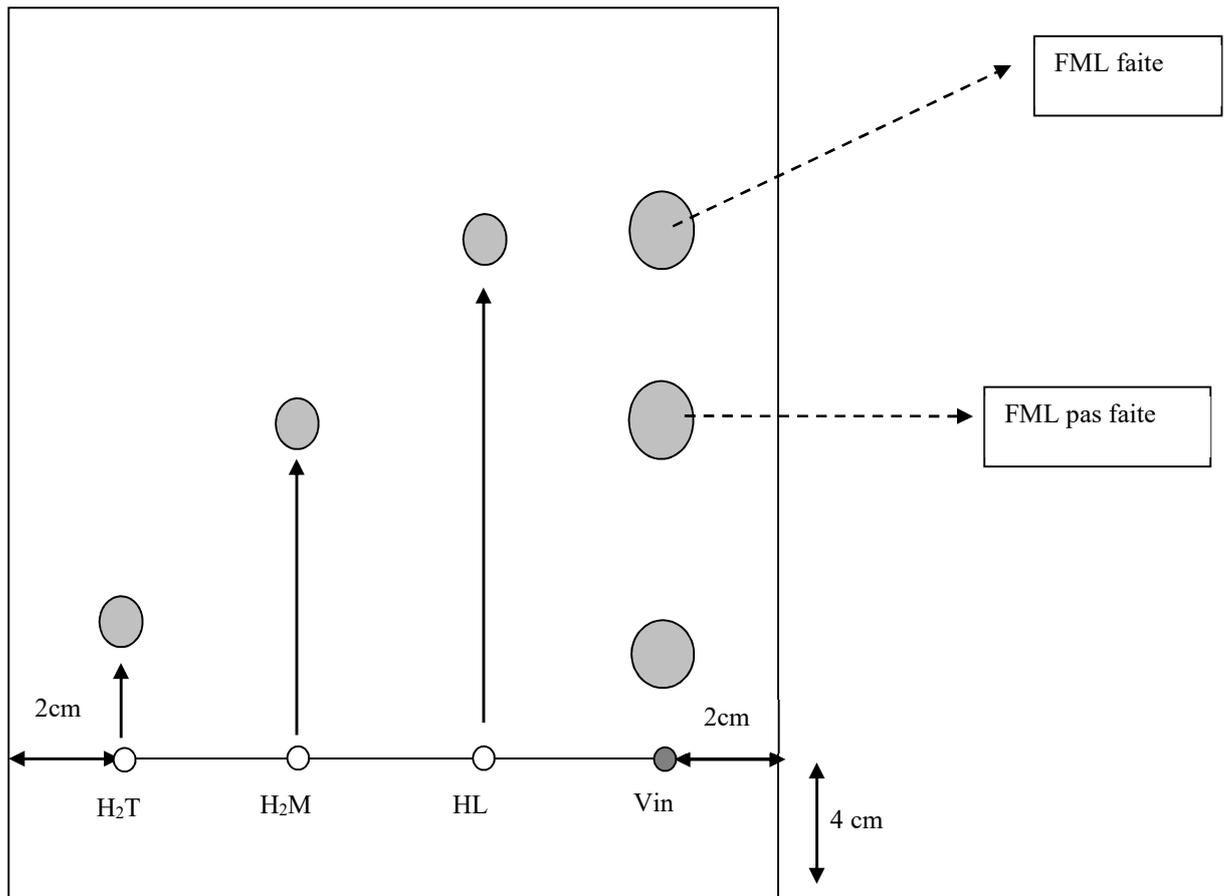
### 3.1.4 Mise en évidence de la fermentation malolactique

#### PRINCIPE

Les acides malique, lactique et tartrique présents dans le vin sont séparés par chromatographie ascendante sur papier avec un solvant butanol (200 ml) – acide acétique (80 ml), additionné de Bleu de Bromophénol (BB). Les acides apparaissent comme des tâches jaunes sur un fond bleu, puisque le BB est jaune à pH 3 et bleue à pH supérieur à 4,6. La présence des acides individuels est mise en évidence par l'application des étalons individuels sur le papier. La distance que les acides ont parcouru divisée par la distance parcouru par le solvant donne le facteur de rétention ( $R_f$ ) et ce chiffre doit être environ 0,1 - 0,2 pour l'acide tartrique, 0,4 - 0,6 pour l'acide malique et 0,6 - 0,9 pour les acides lactique et succinique.

#### MODE OPERATOIRE

1. Déposer 10  $\mu$ l des 3 solutions étalons en 7-8 fois. Sécher chaque fois entre les dépôts.
2. Poser le papier sur le portoir avec les pinces à cet effet.
3. Placer le papier dans le solvant (0,5 cm de hauteur environ) et effectuer une chromatographie ascendante sur 15 – 20 cm (environ 2 à 3 heures)
4. Faire sécher le papier sous la hotte à l'abri de vapeur acide (sécher avec un sèche-cheveux si nécessaire).
5. Si les spots ne sont pas très visibles, mettre le papier entre 2 feuilles de papier et observer le lendemain.



## 3.2 Titre alcoométrique volumique (TAV)

### INTRODUCTION

Le titre alcoométrique, exprimé en degrés alcooliques volumétriques, est égal au nombre de litres d'alcool éthylique contenus dans 100 litres de vin, ces volumes étant tous deux mesurés à la température de 20 °C. Comme dans la pratique on ne sépare pas exactement l'alcool éthylique de ses homologues qui existent en petite quantité dans le vin, l'ensemble des alcools volatils sera mesuré comme alcool éthylique. De même l'alcool des esters est compris dans le degré alcoolique.

Le titre alcoométrique volumique d'un vin peut aussi être exprimé aussi en g/L en multipliant par la masse volumique de l'éthanol (0,78924 g/mL)

$$1 \% \text{ vol.} = 10 \text{ mL/l} = 7,8924 \text{ g/L}$$

Le titre alcoométrique d'un vin peut-être déterminé par pycnométrie, aréométrie, densimétrie de flexion ou encore réfractométrie différentielle. Il s'agit de méthodes physiques indirectes : on effectue les dosages sur un distillat du vin, obtenu par entraînement à la vapeur.

#### 3.2.1 Préparation du distillat

Le vin est distillé suivant l'addition d'une quantité de lait de chaux suffisante pour dépasser la neutralisation de 20 % environ, (*Normalement, on introduit  $0,5 \times n + 2 \text{ mL}$  de lait de chaux à 12 g de CaO pour 100 mL,  $n$  = le volume de NaOH N/10 utilisé pour titrer l'acidité totale de 10 mL de vin, mais en général un volume de **9 mL** est suffisant*).

On utilise l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau décrit à propos du dosage de l'acidité volatile.

1. Affranchir une fiole jaugée de **250 mL** avec le vin, la remplir jusqu'au trait de jauge ;
2. Verser 9 mL de lait de chaux homogénéisé dans le ballon de l'appareil à distillation
3. Verser le vin dans le ballon ;
4. Rincer, au moins trois fois, la fiole avec environ 5 mL de l'eau distillée (pissette) et verser dans le ballon ;
5. Boucher le ballon et placer la fiole jaugée sous la sortie de la colonne de refroidissement ;
6. Démarrer la distillation ;
7. Quand la fiole est à moitié remplie, rincer le tube latéral avec un jet de pissette afin de récupérer les premières vapeurs piégées dans celui-ci ;
8. Retirer la fiole environ quand le distillat arrive à environ 2 cm avant le trait de jauge ;
9. Boucher la fiole

Après au moins 4 heures, ou idéalement le lendemain (que le distillat s'équilibre avec la température ambiante) réajuster avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge

### 3.2.2 Mesure du TAV du distillat

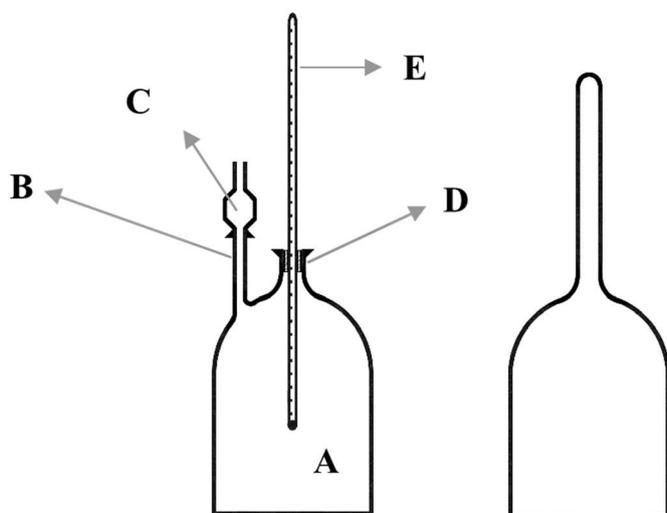
#### **PYCNOMETRIE (METHODE TYPE I)**

La pycnométrie constitue une « méthode de référence » et ses résultats sont connus avec une précision de 1/10000, exprimés à la température de référence de 20 °C. On utilise un pycnomètre de Jaulmes en pyrex de capacité 100 (+/- 0,01) mL avec un thermomètre mobile à rodage émeri gradué par 1/10 de degré, de 10 à 30 °C. Le thermomètre doit être soigneusement contrôlé et les deux rodages de l'appareil doivent être faits avec un très grand soin. Le pycnomètre comporte un tube latéral de 15 mm de longueur et de 1 mm (au plus) de diamètre intérieur, terminé par une partie conique rodée. Ce tube est coiffé par une « **chambre de dilatation** » constituée par un tube conique rodé, terminé par une partie effilée.

Le pycnomètre doit toujours être accompagné de son flacon tare. Son rôle sera de permettre de suivre les variations de la poussée de l'air sur le poids du pycnomètre rempli. C'est un récipient de même volume extérieur que le pycnomètre et sa capacité extérieure doit être égale à la capacité extérieure du pycnomètre plein, à moins de 1 mL près. Elle est remplie avec une solution d'un sel métallique tel que le chromate de potassium, de densité telle que sa masse soit toujours > que la masse du pycnomètre plein d'un liquide de densité 1,01.

On effectue la mesure sur une balance (de précision à 0,00001 g près) en utilisant un pycnomètre dont les constantes ont déjà été déterminées.

#### **PYCNOMETRE DE JAULMES ET SA TARE**



- A- Corps du pycnomètre**
  - B- Tube capillaire latéral rodé**
  - C- Chambre de dilatation *si dilatation***
  - D- Col rodé**
  - E- Thermomètre avec rodage**
- (livré avec certificat d'étalonnage 5 à 6 points)*

#### ***CALCUL DE $\rho_t$***

1. Faire le « 0 » mécanique sur la balance ;
2. Poser la tare sur la balance (*vérifier que la tare est bien nettoyée*) ;
3. Affranchir le pycnomètre avec le distillat ;
4. Verser le distillat dans le pycnomètre et reboucher la fiole jaugée ;
5. Bien vérifier qu'il y ait du distillat dans le tube latéral (et l'absence de bulles d'air)
6. Mettre le thermomètre en place ;
7. Essuyer le pycnomètre (attention au phénomène de capillarité avec le papier au niveau de la tubulure) ;
8. Lire la température : se placer bien en face du loup pour éviter les erreurs de parallaxe

9. Noter la température ;
10. Immédiatement mettre le chapeau en place ;
11. Noter le poids de la tare ;
12. Peser le pycnomètre.

Les caractéristiques du pycnomètre sont :  $P_0$ ,  $T_0$  et  $V_0$ . Ce sont les constantes d'un pycnomètre donné et de sa tare assortie, et elles sont mesurées à 20 °C et à une pression atmosphérique d'un bar par un service d'étalonnage de poids et mesures.

- $P_0$  = La masse du pycnomètre vide ;  
 $T_0$  = La masse de la tare ;  
 $V_0$  = Le volume du pycnomètre ;

Les valeurs qui doivent être lues et calculées sont :

- $T_1$  = la masse du flacon de tare à  $t$  °C elle sert à corriger la masse du pycnomètre rempli de distillat le jour de la mesure ;  
 $P_2$  = la masse du pycnomètre rempli du distillat ;  
 $\Delta T$  =  $T_1 - T_0$  ;  
 $P'_0$  = la masse du pycnomètre vide d'air, corrigé pour la poussée de l'air sur le pycnomètre dans les conditions utilisées ;  
 $P'_0$  =  $P_0 \pm \Delta T$ .

La masse volumique à une température,  $t$  °C,  $\rho_t$  du vin est calculée en utilisant la formule :

$$\rho_t = \frac{P_2 - P'_0}{V_0}$$

**Rappel** : La tare est utilisée pour déterminer  $P'_0$ ,

Utiliser les **Table de conversion  $\rho_t \rightarrow TAV$**  en fonction de la température et du TAV pour convertir  $\rho_t$  calculée en TAV

**Exemple de calcul sur la page suivante**

## Etape 2: Calculs

## Exemple

(a) Constants du pycnomètre

$$V_{20} = 100,4985 \text{ ml} \quad P_0 = 66,4852 \quad T_0 = 167,9756 \text{ g}$$

(b) Mesuré

$$\begin{aligned} T^{\circ}\text{C} &= 21,3^{\circ}\text{C} \\ T^{\circ}\text{C corrigée} &= 21,32^{\circ}\text{C} \\ T_1 &= 168,0097 \text{ g} \\ P_2 &= 165,4198 \text{ g} \end{aligned}$$

(c) Calcul de  $\rho_t$ 

$$\begin{aligned} \Delta T &= T_1 - T_0 = + 0,0341 \text{ g} \\ P'_0 &= P_0 + \Delta T = 66,5193 \text{ g} \\ \rho_t &= (P_2 - P'_0) / V_0 = \frac{165,4198 \text{ g} - 66,193 \text{ g}}{100,4985 \text{ ml}} \\ &= 0,98410 \text{ g/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \rho_t &= 0,98410 \text{ (x 1000 = 984,10)} \\ T^{\circ}\text{C corrigée} &= 21,32^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

On trouve cette valeur de  $\rho_t$  entre 10 et 11% TAV

	10% vol	11% vol	
21°C	984,47	983,28	Pour t°C à 10% vol. : 1°C : $\Delta = 0,24$ → 0,32°C $\Delta = 0,0768^*$
$\Delta$	0,24	0,26	
22°C	984,23	983,02	Pour t°C à 11% vol. : 1°C $\Delta = 0,26$ → 0,32°C $\Delta = 0,0832^*$
21,32°C:	984,3932	983,1968	

\*Retrancher ces valeurs de  $\rho$  à 21°C car quand la t°C ↗,  $\rho$  ↘

21,32°C	10% vol	$\Delta$	11% vol
	984,3932	1,1964	983,1968

Pour 1% vol,  $\Delta = 1,1964$

$$984,3932 - 984,10 = 0,2932$$

$$\rightarrow \Delta 0,2932 \equiv \frac{1\% \text{ vol} \times 0,2932}{1,1964}$$

2 chiffres après le virgule

$$= 0,245\% \text{ vol.}, \text{ à ajouter à } 10\% \text{ vol.} \rightarrow 10,25\% \text{ vol}$$

**Table de conversion pt → TAV**

TAV % Vol											
<b>Temp°C</b>	<b>6</b>		<b>7</b>		<b>8</b>		<b>9</b>		<b>10</b>		<b>11</b>
<b>15</b>	990,63	1,27	989,36	1,24	988,12	1,21	986,91	1,18	985,73	1,14	984,59
<b>16</b>	990,47	1,27	989,20	1,25	987,95	1,21	986,74	1,19	985,55	1,15	984,40
<b>17</b>	990,30	1,28	989,02	1,25	987,17	1,22	986,55	1,19	985,36	1,16	984,20
<b>18</b>	990,12	1,28	988,84	1,26	987,58	1,23	986,35	1,20	985,15	1,17	983,98
<b>19</b>	989,93	1,29	988,64	1,26	987,38	1,23	986,15	1,21	984,94	1,10	983,76
<b>20</b>	989,73	1,29	988,44	1,27	987,17	1,24	985,93	1,22	984,71	1,19	983,52
<b>21</b>	989,52	1,30	988,22	1,27	986,95	1,25	985,70	1,23	984,47	1,19	983,28
<b>22</b>	989,30	1,31	987,99	1,28	986,71	1,25	985,46	1,23	984,23	1,21	983,02
<b>23</b>	989,06	1,31	987,75	1,28	986,47	1,26	985,21	1,24	983,97	1,20	982,77
<b>24</b>	988,82	1,32	987,50	1,29	986,21	1,26	984,95	1,25	983,70	1,22	982,48
<b>25</b>	988,56	1,32	987,24	1,29	985,95	1,27	984,68	1,26	983,42	1,22	982,20
<b>26</b>	988,30	1,32	986,98	1,31	985,67	1,27	984,40	1,26	983,14	1,24	981,90
<b>27</b>	988,03	1,33	986,70	1,31	985,39	1,28	984,11	1,27	982,84	1,24	981,60
<b>28</b>	987,74	1,33	986,41	1,31	985,10	1,29	983,81	1,28	982,53	1,25	981,28
<b>29</b>	987,45	1,34	986,11	1,32	984,79	1,29	983,50	1,28	982,22	1,26	980,96
<b>30</b>	987,14	1,34	985,80	1,32	984,48	1,30	983,18	1,28	981,90	1,27	980,63

**Table de conversion pt → TAV**

TAV % Vol														
<b>Temp°C</b>	<b>11</b>		<b>12</b>		<b>13</b>		<b>14</b>		<b>15</b>		<b>16</b>		<b>17</b>	
<b>15</b>	984,59	1,12	983,47	1,09	982,38	1,08	981,30	1,05	960,25	1,04	979,21	1,01	978,20	
<b>16</b>	984,40	1,13	983,27	1,11	982,16	1,08	981,08	1,07	980,01	1,04	978,97	1,04	977,93	
<b>17</b>	984,20	1,14	983,06	1,12	981,94	1,09	980,85	1,08	979,77	1,06	978,71	1,05	977,66	
<b>18</b>	983,98	1,14	982,84	1,13	981,71	1,11	980,60	1,09	979,51	1,07	978,44	1,06	977,38	
<b>19</b>	983,76	1,16	982,60	1,13	981,47	1,12	980,35	1,10	979,25	1,09	978,16	1,07	977,09	
<b>20</b>	983,52	1,16	982,36	1,15	981,21	1,13	980,08	1,11	978,97	1,10	977,87	1,08	976,79	
<b>21</b>	983,28	1,18	982,10	1,15	980,95	1,14	978,81	1,12	978,69	1,11	977,58	1,10	976,48	
<b>22</b>	983,02	1,18	981,84	1,17	980,67	1,15	979,52	1,13	978,39	1,12	977,27	1,12	976,15	
<b>23</b>	982,77	1,20	981,57	1,18	980,39	1,16	979,23	1,15	978,08	1,13	976,95	1,13	975,82	
<b>24</b>	982,48	1,20	981,28	1,18	980,10	1,17	978,93	1,16	977,77	1,15	976,62	1,13	975,49	
<b>25</b>	982,20	1,21	980,99	1,20	979,79	1,18	978,61	1,17	977,44	1,15	976,29	1,15	975,14	
<b>26</b>	981,90	1,22	980,68	1,20	979,48	1,19	978,29	1,18	977,11	1,17	975,94	1,16	974,78	
<b>27</b>	981,60	1,23	980,37	1,21	979,16	1,20	977,96	1,19	976,77	1,18	975,59	1,17	974,42	
<b>28</b>	981,28	1,23	980,05	1,22	978,83	1,21	977,62	1,20	976,42	1,19	975,23	1,19	974,04	
<b>29</b>	980,96	1,24	979,72	1,23	978,49	1,22	977,27	1,21	976,06	1,20	974,86	1,20	973,66	
<b>30</b>	980,63	1,25	979,38	1,24	978,14	1,23	976,91	1,22	975,69	1,21	974,48	1,22	973,26	

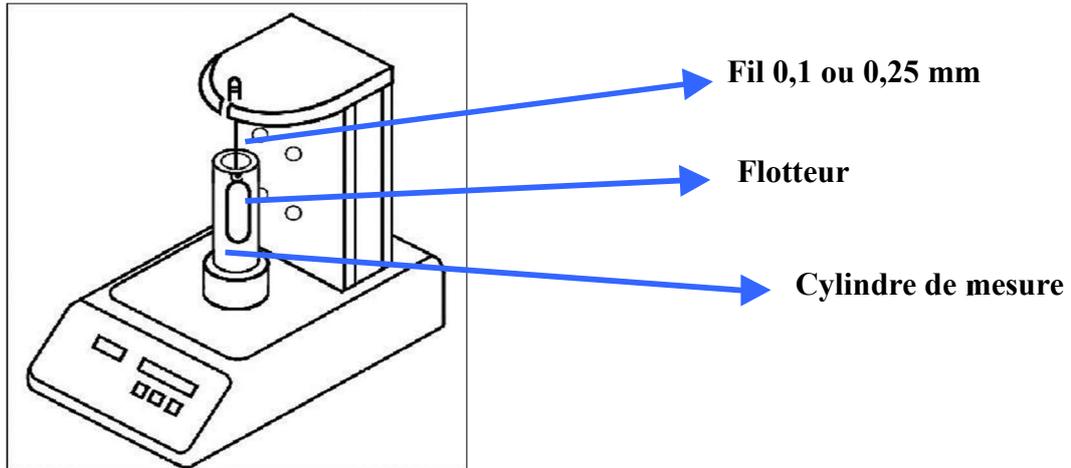
## BALANCE HYDROSTATIQUE (METHODE TYPE I)

### INTRODUCTION

Le système de mesure du TAV selon le principe de la balance hydrostatique se compose de deux matériels (DENSIMAT et ALCOMAT).

La mesure s'effectue au niveau du DENSIMAT

- affichage de la densité du mélange hydroalcoolique
- affichage de la température,
- détermination du TAV après correction de la température à 20 °C



L'exploitation des tables de corrélation entre densité du mélange hydroalcoolique et TAV s'effectue au niveau de l'ALCOMAT.

Comme pour l'aréométrie, la détermination du TAV s'effectue à partir de la mesure de la masse volumique du mélange hydroalcoolique selon le principe d'Archimède ; la poussée d'Archimède est d'autant plus faible que la masse volumique du mélange hydroalcoolique l'est.

$$PA = \rho \times V \text{ (} V = \text{volume de liquide déplacé)}$$

Cependant, on mesure le volume de liquide déplacé en aréométrie (poussée d'Archimède constante) alors que la mesure avec la balance hydrostatique s'effectue avec un volume constant, la poussée d'Archimède étant liée directement, à température constante, à la valeur de la masse volumique du distillat. Ces paramètres étant calculée automatiquement, ces valeurs sont affichées directement sur l'écran.

### MODE OPERATOIRE

1. Affranchir le cylindre de mesure avec un peu de distillat ( $\times 3$ ) ;
2. Verser le distillat dans le cylindre de mesure jusqu'à atteindre le niveau (70 mL) ;
3. Plonger le flotteur dans le liquide et insérer sur le bord du cylindre la sonde de température ;
4. Agiter le flotteur pour homogénéiser la température du distillat en évitant de créer des bulles d'air adhérentes au flotteur ;
5. Bien positionner le cylindre sur le "centre cylindre" puis accrocher le flotteur sur sa suspension ;

6. Lire la valeur de TAV après arrêt de clignotement et émission d'un bip sonore.

## DENSIMÈTRE ÉLECTRONIQUE (MÉTHODE TYPE I)

Le densimètre électronique comporte les éléments suivants :

- une cellule de mesure comportant le tube de mesure et une enceinte thermostatée ;
- un système de mise en oscillation du tube et de mesure de la période d'oscillation ;
- une horloge ;
- un afficheur numérique et éventuellement un calculateur ;

### PRINCIPE

Le principe consiste à mesurer la période d'oscillation d'un tube contenant l'échantillon soumis à une excitation électromagnétique. La masse volumique est alors calculée, elle est liée à la période d'oscillation par la formule suivante :

$$p = T^2 \times \left( \frac{C}{4\pi^2 V} \right) - \left( \frac{M}{V} \right)$$

$\rho$  = masse volumique de l'échantillon

$T$  = période d'oscillation induite

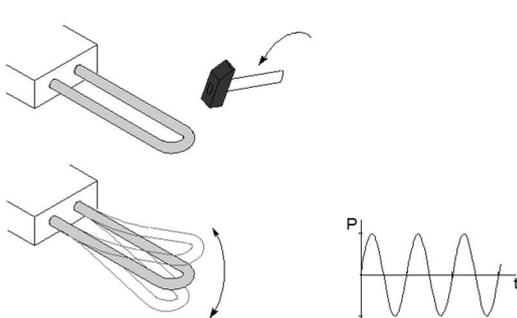
$M$  = masse du tube vide

$C$  = constante de rappel

$V$  = volume de l'échantillon en vibration

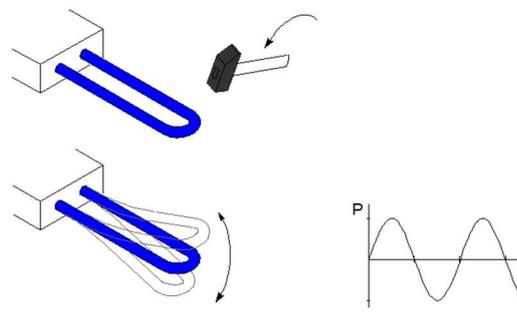
Cette relation est de la forme,  $p = A T^2 - B$ , il existe donc une relation linéaire entre la masse volumique et la période d'oscillation au carré. Les constantes A et B sont spécifiques de chaque oscillateur et sont estimés en mesurant la période de fluides de masse volumique connue.

#### U-tube rempli d'air:



$\rho$  basse  $\rightarrow$  fréquence haute

#### U-tube rempli d'eau:



$\rho$  haute  $\rightarrow$  fréquence basse

**Si  $\rho \nearrow$ , la fréquence  $\searrow$**

**Fréquence (f) = 1/période d'oscillation (T)**

## *CALIBRATION DE L'APPAREIL*

L'appareil doit être calibré avant sa première utilisation, puis tous les six mois ou si la vérification ne donne pas satisfaction. L'objectif est d'utiliser deux fluides de référence pour calculer les constantes A et B. En principe cette calibration est effectuée avec de l'air sec (tenir compte de la pression atmosphérique) et de l'eau très pure (bi-distillée et/ou microfiltrée de résistivité très élevée, par exemple  $> 18 \text{ M}\Omega$

## *CONTROLE DE TEMPERATURE ET CELLULE DE MESURE*

Le tube de mesure est situé dans une enceinte thermostatée. La stabilité de la température doit être meilleure que  $\pm 0,02 \text{ }^\circ\text{C}$ . Il est nécessaire de contrôler la température de la cellule car celle-ci influence fortement les résultats des déterminations. La masse volumique d'une solution hydroalcoolique de TAV 10 % Vol., est de  $0,98471 \text{ g/mL}$  à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  et de  $0,98447 \text{ g/mL}$  à  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  soit un écart de  $0,00024 \text{ g/mL}$ . La température d'essai est arrêtée à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . La mesure de température au de la cellule est réalisée avec un thermomètre de résolution de moins de  $0,01 \text{ }^\circ\text{C}$  et raccordé aux étalons nationaux. Il doit garantir une mesure de température d'incertitude inférieure à  $\pm 0,07 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## *MODE OPERATOIRE*

L'opérateur s'assure de la stabilité de la température de la cellule de mesure. Le distillat dans la cellule du densimètre ne doit pas contenir de bulles d'air et doit être homogène. Si l'on dispose d'un système d'éclairage qui permet de vérifier l'absence de bulles, l'éteindre rapidement après la vérification car la chaleur générée par la lampe influe sur la température de mesure.

Le densimètre est placé sur un support parfaitement stable et est isolé de toutes vibrations.

***Protocole : Voir la fiche de l'appareil « Densimètre de Paar***

Le titre alcoométrique volumique du vin est celui obtenu pour le distillat. Il est exprimé en % vol.

## *REMARQUES*

Le volume introduit dans la cellule doit être suffisamment important afin d'éviter une éventuelle contamination provoquée par l'échantillon précédent. Il est donc nécessaire de réaliser **au moins deux déterminations**. Si celles-ci ne donnent pas des résultats inclus dans la limite de répétabilité, une troisième détermination est nécessaire. Généralement les résultats des deux dernières déterminations sont homogènes et on élimine la première valeur.

## *REPETABILITE*

Pour des échantillons de TAV compris entre 4 et 18 % Vol.

Répétabilité (r) =  $0,067$  (% vol.),

## **AEROMETRIE (METHODE TYPE IV)**

### ***Utiliser 250 mL distillat***

## *PRINCIPE*

Le dosage de l'alcool par aréométrie consiste en la mesure du titre alcoométrique employant un aréomètre calibré en % alcool, c'est à dire un **alcoomètre**. L'alcoomètre est à utiliser uniquement sur

les mélanges hydroalcooliques c'est-à-dire, le distillat obtenu par entraînement du vin à la vapeur d'eau. La température (à 0,1 °C près) du distillat est prise simultanément.

Le titre alcoométrique lu sur l'alcoomètre est ensuite corrigé pour la température en utilisant la table de correction sur la page 79.

#### *MATERIEL*

On doit employer uniquement des alcoomètres gradués par 1/10<sup>ème</sup> de degré, avec distance *minima* entre deux degrés consécutifs de 8 mm (masse de l'aréomètre 60 g). Le coefficient de dilatation cubique du verre employé doit être compris entre 0,00020 et 0,00025. Ces appareils doivent être contrôlés par l'Etat en 5 points de leur graduation.

On utilisera un thermomètre gradué en degrés et dixième de degré de 0 à 30 °C vérifié au vingtième de degré près.

L'éprouvette sera constituée par un tube cylindrique de **36 mm** de diamètre et **320 mm de hauteur**, tenu verticalement grâce à des vis calantes. Le diamètre intérieur de l'éprouvette doit, de toute façon, dépasser de **6 mm** au moins de diamètre de la carène de l'alcoomètre.

#### *MODE OPERATOIRE*

1. Verser la totalité du distillat sans l'éprouvette ;
2. Introduire le thermomètre et l'alcoomètre et attendre 2 minutes ;
3. Faire une ou deux lecture(s) et noter la température **A, a** °C (se placer bien en face pour éviter les erreurs de parallaxe) ;
4. Enlever le thermomètre ;
5. Ajuster le support ;
6. Lire le degré alcoolique qui correspond au titre alcoométrique apparent ;
7. Récupérer le distillat et reboucher la fiole.

Puisque on lit la valeur du TAV non-corrigée directement sur l'alcoomètre, les valeurs dans cette table sont des **valeurs de correction** exprimées en TAV. On trouve les valeurs de correction dans les tables **sur la page suivante**.

Si la température lue est **inférieure** à 20 °C, on AJOUTE la valeur de la correction à la valeur de TAV lue.

Si la température lue est **supérieure** à 20 °C, on SOUSTRAIT la valeur de la correction de la valeur de TAV lue.

On observe que plus la température lue approche 20 °C, moins le facteur de correction est important.

**Corrections à effectuer sur le titre alcoométrique apparent pour corriger l'action de la température.  
Ajouter (T < 20 °C) ou retrancher (T > 20 °C) la correction**

TAV apparent % Vol												
Temp°C	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
15	0,64	0,68	0,73	0,77	0,83	0,89	995	1,02	1,09	1,16	1,24	1,32
16	0,53	0,56	0,6	963	0,67	0,72	0,77	0,82	0,88	0,94	1	1,06
17	0,41	0,43	0,46	0,48	0,51	0,55	0,59	0,62	0,67	0,71	0,75	0,8
18	0,27	0,29	0,31	0,33	0,35	0,37	0,4	0,42	0,45	0,48	0,51	0,53
19	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,2	0,21	0,23	0,24	0,25	0,27
21	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,19	0,2	0,22	0,23	0,25	0,26	0,28
22	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,44	0,47	0,49	0,52	0,55
23	0,47	0,49	0,51	0,54	0,57	0,6	0,63	0,66	0,7	0,74	0,78	0,82
24	0,64	0,67	0,7	0,73	0,77	0,81	0,85	0,89	0,94	0,99	1,04	1,1
25	0,82	0,85	0,89	0,93	0,97	1,02	1,07	1,13	1,19	1,25	1,31	1,37
26	1	1,04	1,08	1,13	1,18	1,24	1,3	1,36	1,43	1,5	1,57	1,65
27	1,19	1,23	1,28	1,34	1,4	1,46	1,53	1,6	1,68	1,76	1,84	1,93
28	1,38	1,43	1,49	1,55	1,62	1,69	1,77	1,85	1,93	2,02	2,11	2,21
29	1,58	1,63	1,7	1,76	1,84	1,92	2,01	2,1	2,19	2,29	2,39	2,5
30	1,78	1,84	1,91	1,98	2,07	2,15	2,25	2,35	2,45	2,56	2,67	2,78

### 3.2.3 Ébulliométrie (méthode non-officielle)

**Du fait que la détermination du TAV par cette technique demande environ 500 mL d'échantillon, elle vous sera présentée en démonstration**

#### **INTRODUCTION**

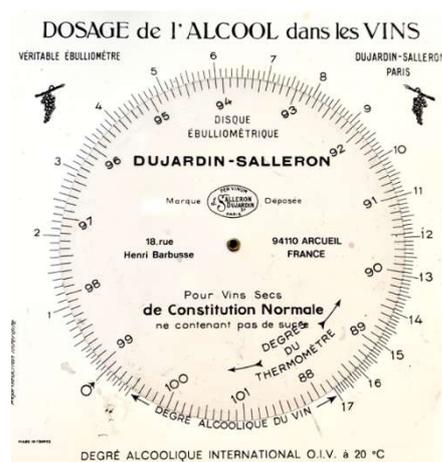
L'ébulliométrie a été utilisée pour déterminer le TAV du vin depuis le 19<sup>e</sup> siècle. Contrairement aux méthodes précédentes, l'ébulliométrie est une méthode directe pour déterminer le TAV ? dans la mesure où le dosage s'effectue directement sur le vin et non pas sur le distillat de celui-ci. Le principe repose sur la variation de la température d'ébullition d'un vin en fonction de sa concentration en alcool : plus la teneur en alcool est importante, plus la température d'ébullition est faible.

Il ne s'agit pas d'une méthode officielle du fait que la précision de la méthode manuelle (pour laquelle des ébulliomètres sont toujours disponibles) est très faible, avec des écarts pouvant aller à 0,5 % vol. Cependant, des appareils électroniques plus modernes annonçant une précision de l'ordre de 0,1 % sont commercialisés depuis quelques années, et leur utilisation dans des structures de taille moyenne ne cesse pas de croître, surtout dans les pays producteurs du nouveau monde.

#### **OPERATION**

L'opération est menée en deux temps. On détermine, d'abord, la température d'ébullition de l'eau pure, au moment et au lieu de l'expérience. On chauffe ensuite le vin jusqu'à ébullition, qui, dans l'appareil électronique au laboratoire, prend environ 6 mn.

Il suffit de relever la température d'ébullition d'un vin pour en déduire le degré alcoolique du vin sur un disque d'ébulliomètre.



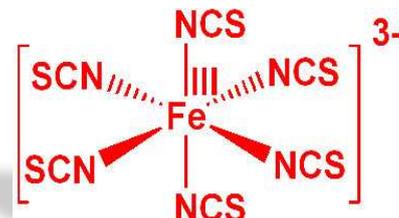
Il existe également des logiciels de calcul pour convertir la température d'ébullition du vin en % vol.

### 3.3 Matières minérales

#### 3.3.1 Dosage du fer : méthode spectrophotométrique

##### PRINCIPE

Basé sur la complexation des cations ferriques par les anions thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) pour former un complexe coloré rouge de sulfocyanure ferrique, selon la réaction :



Une solution concentrée d'HCl est ajoutée au préalable afin de libérer le fer des sels complexes (notamment citrate de fer).

En général, cette méthode sert uniquement à mesurer le  $\text{Fe}^{3+}$ . Toutefois, en ajoutant de l'eau oxygénée diluée (1 vol.), le fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  est oxydé en fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$ , ce qui permet le dosage du fer total. En effectuant deux dosages (avec et sans l'étape d'oxydation avec l'eau oxygénée  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) il sera possible de déterminer les concentrations respectives de  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ .

##### MODE OPERATOIRE

Dans **12 tubes à essai** préparer les solutions suivantes :

mg/L	Gamme Etalons						Témoin Gamme	Vin*	Témoin Vin
		2.5	5	10	15	20			
<b>Fer 20 mg/L</b>	mL	0.25	0.5	1	1.5	2	0	0	0
<b>Vin</b>	mL	0	0	0	0	0	0	2	2
<b>HCl 1 %</b>	mL	1.75	1.5	1	0.5	0	2	0	1
<b>HCl 5 %</b>	mL	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>KSCN 20 %</b>	mL	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 vol.</b>	gtts	4	4	4	4	4	4	4	4

**\*Préparer 5 répétitions de votre vin.**

1. Bien agiter les tubes ;
2. Mesurer l'absorbance après 15 min (+/- 1 min) pour chaque tube. ;
3. Effectuer la mesure de l'absorbance à 480 nm ;
4. Faire le « zéro » avec le TEMOIN GAMME et mesurer l'absorbance des 5 étalons en ordre croissant de concentration. Affranchir la cuve **une fois** avec chaque solution ;
5. Rincer la cuve à l'eau ;
6. Refaire le « zéro » avec le TEMOIN VIN (penser à affranchir) et mesurer l'absorbance des 5 échantillons de vin

Si la valeur est plus faible que la valeur de l'absorbance du premier point de la gamme étalon, cela peut être dû à une absorbance du blanc trop important (contamination avec du fer) ou à un manque d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour oxyder tout le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ , ou encore à un excès de  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui a oxydé une partie du SCN.

### **GAMME D'ETALONNAGE**

Rentrer vos valeurs d'absorbance sur le fichier EXCEL fourni ; noter la pente et l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination ( $r^2$ ). Ce dernier exprime l'étroitesse de l'accord entre les valeurs de l'abscisse et celles de l'ordonné. Il ne renseigne pas la linéarité de la courbe, et ne constitue qu'une étape exploratoire qui doit être validée par un test de significativité de la relation entre les deux variables. Dans le contexte de ces TP, on peut effectuer la première étape de tests de significativité, c'est-à-dire la détermination de la justesse, qui est l'étroitesse de l'accord entre les valeurs nominales de concentration et celles obtenues par interpolation des valeurs d'absorbance sur la gamme d'étalonnage.

Alors faire l'interpolation de chaque valeur d'absorbance mesurée sur votre gamme d'étalonnage pour donner 5 nouvelles valeurs de concentrations « obtenues ».

Tracer une courbe des valeurs de concentration obtenues (ordonné) vs les valeurs nominales (abscisse). Déterminer la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination. Plus les valeurs de ces trois paramètres sont proches de respectivement 1, 0 et 1, plus la justesse de votre gamme est élevée !

### **QUANTIFICATION ET REPETABILITE**

Calculer la concentration du fer dans vos 5 échantillons de vin. Déterminer la moyenne, l'écartype et le coefficient de variation (CV en %) entre vos 5 échantillons. Plus la du CV est basse, plus vos résultats sont répétables !

### **3.3.2 Dosage du cuivre : méthode spectrophotométrique**

#### **PRINCIPE**

Le cuivre est dosé sous forme de complexe avec le diéthylldithiocarbamate. Au préalable on complexe le fer avec une solution citrique-chlorhydrique et on amène la solution au pH alcalin avec de l'ammoniaque pur, 5 N. Le complexe jaune hydrophobe formé entre le cuivre et le diéthylldithiocarbamate est extrait du milieu aqueux avec de l'acétate d'isopentyle (acétate d'isoamyle). Un blanc est préparé en ajoutant tous les réactifs, mais en remplaçant le vin par de l'eau distillée. L'absorbance de la solution à 436 nm est rapportée sur la courbe de calibration fournie, afin de déterminer la concentration en cuivre.

#### **MODE OPERATOIRE**

1. Dans un tube à essai à bouchage émeri, verser 10 mL d'eau (témoin) ou 10 mL de vin (dosage) ;
2. Ajouter 0,5 mL solution citrique chlorhydrique ;

3. Boucher et attendre 1 min ;
5. Ajouter :
  - 1 mL de NH<sub>4</sub>OH (5N)
  - 0,5 mL solution de diéthylthiocarbamate
  - 10 mL d'acétate d'isoamyle
  - 5 mL d'alcool
6. Agiter fortement pendant 30 secondes
7. Laisser reposer
8. Avec une pipette **sèche** enlever la phase organique (*phase supérieure*) dans chaque tube et transvaser-les dans un nouveau tube
9. Ajouter 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre à la phase organique jusqu'à ce que les solutions deviennent totalement limpides
10. Faire le « 0 » avec le témoin à 436 nm. Lire l'absorbance et se reporter sur la courbe de calibration du cuivre (fourni) pour déterminer la concentration de cuivre
11. Exprimer le résultat en mg/L de cuivre

### 3.4 Dioxyde de soufre

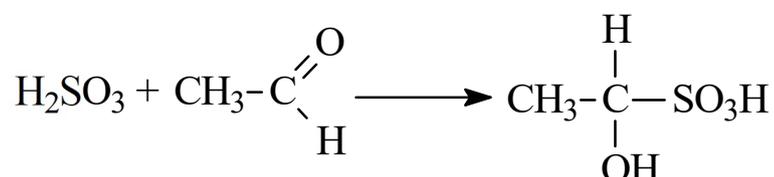
#### INTRODUCTION

Le SO<sub>2</sub> (dioxyde de soufre) est un antiseptique et un antioxydant. On appelle le dioxyde de soufre total l'ensemble des différentes formes de dioxyde de soufre présentes dans le vin à l'état libre ou combiné à ses constituants.

Les limites imposées sur ses concentrations dans les vins (d'après le règlement CE 606/2009) sont :  
 150 mg/L (vins rouges) et 200 mg/L (vins blancs et rosés) si < 5g/L sucres  
 200 mg/L (vins rouges) et 250 mg/L (vins blancs et rosés) si > 5g/L sucres



Dans les vins et les moûts, le SO<sub>2</sub> libre existe sous forme combinée avec l'éthanal, par exemple :



L'équilibre est fonction du pH et de la température. Il peut aussi exister combiné avec des composés carbonyles : Les sucres fixent peu et d'une façon aléatoire le HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, bien qu'ils aient des fonctions aldéhydiques. Il en est de même pour les acides uroniques qui proviennent des acides végétaux. Les acides cétoniques fixent également le SO<sub>2</sub> comme c'est le cas pour l'acide pyruvique. Le dosage du dioxyde de soufre total qui est, en œnologie, réglementairement, commercialement et technologiquement fondamental, reste problématique pour beaucoup de laboratoires.

### 3.4.1 Dosage indirecte par la méthode Franz Paul

La méthode Franz Paul est la méthode de référence (Type II) décrite dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV. Elle doit obligatoirement être utilisée pour calibrer des analyseurs automatisés (IRTF et analyseurs séquentiels) pour des déterminations en routine du SO<sub>2</sub> libre et total dans les moûts et les vins. D'ailleurs, lorsque la quantité de dioxyde de soufre trouvée par des méthodes plus rapides (Ripper, potentiométrie) avoisine ou dépasse la limite légale, il convient de doser le dioxyde de soufre total par la méthode de référence.

#### **PRINCIPE**

Le dioxyde de soufre est entraîné par un courant d'air ou d'azote ; il est fixé et oxydé par barbotage dans une solution diluée et neutre d'eau oxygénée. L'acide sulfurique formé est dosé par une solution titrée de sodium.

Le dioxyde de soufre libre est extrait du vin par entraînement à froid (sans chauffage)

Le dioxyde de soufre total est extrait du vin par entraînement à chaud (100 °C)

La prise d'essai est préalablement acidifiée avec de l'acide ortho-phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) afin de s'assurer que tout le dioxyde de soufre soit sous forme de H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> qui est la forme solubilisée du SO<sub>2</sub>. On pousse l'équilibre de la réaction vers la gauche :

Le SO<sub>2</sub> est entraîné par un courant d'air pendant 15 minutes exactement et est barboté dans une solution diluée et neutre de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui oxyde le dioxyde de soufre en acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est ensuite dosé par une solution titrée de NaOH 0,01 N. Comme l'oxydation du dioxyde de soufre implique 2 électrons la masse d'un équivalent de SO<sub>2</sub> est donc : 64/2 = 32 g/éq

#### **EMPLOI DU H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> :**

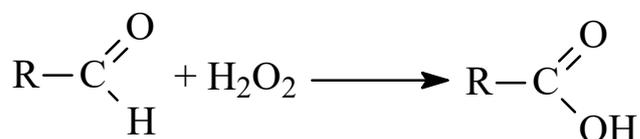
HCl, et HNO<sub>3</sub> sont des acides forts qui se dissocient complètement en solution aqueuse. Il faut en mettre très peu car certaines substances du vin craignent l'hydrolyse acide ou alcaline. De plus HNO<sub>3</sub> est volatil et pourrait être entraîné par le barbotage. Le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ne pourrait pas être utilisé car une partie passerait dans le courant d'air, acidifiant ainsi le contenu de la fiole B. Par contre H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> est un acide moins fort qui existe en équilibre en solution aqueuse



En choisissant cet acide on évite certaines décompositions acides, et en plus on augmente la température jusqu'à environ 103 °C (avec HCl ou autres, la température n'augmente que jusqu'à 93 °C uniquement). La réaction est donc plus rapide avec l'acide phosphorique

#### **DUREE DU BARBOTAGE DE 15 MINUTES :**

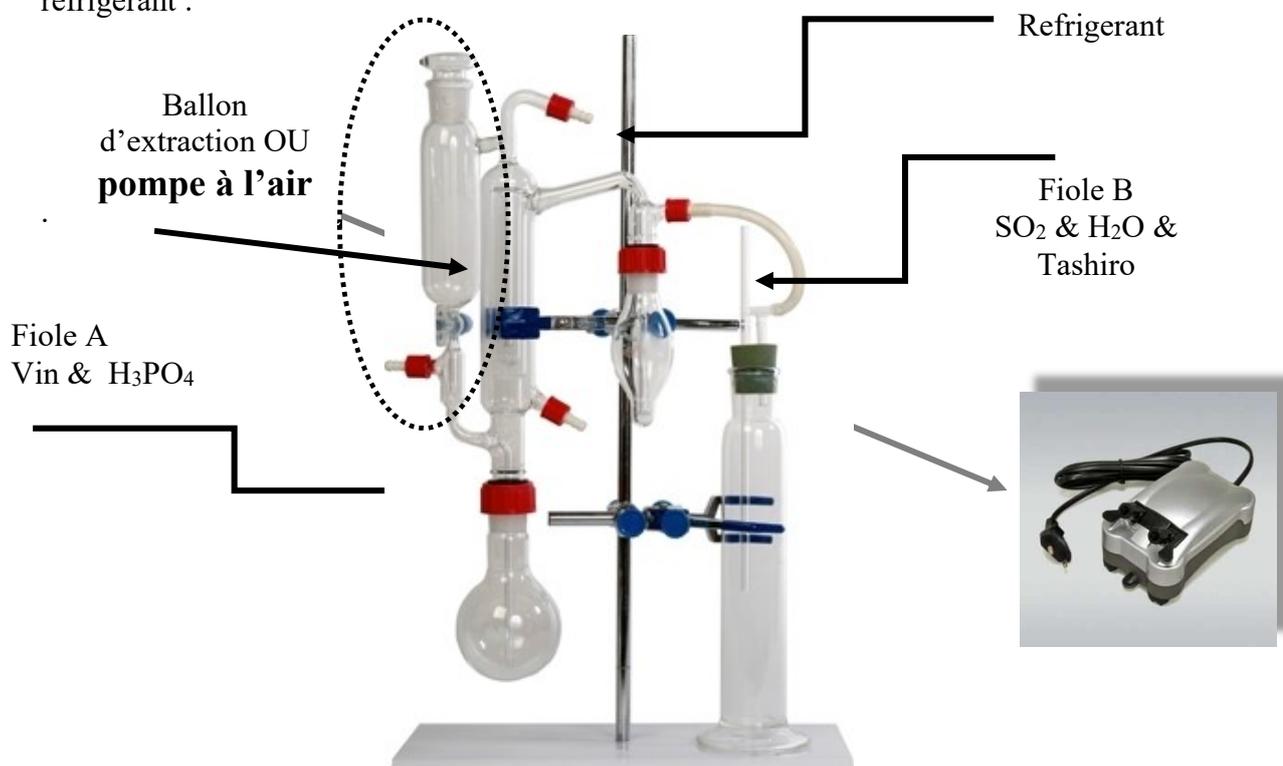
En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les aldéhydes sont convertis en acides organiques qui ont une certaine volatilité :



D'ailleurs, quand le  $\text{CO}_2$  est dissout dans l'eau, il forme un acide faible. Les 15 minutes correspondent au temps au bout duquel il doit manquer un peu de  $\text{SO}_2$  mais il est compensé par un peu d'aldéhydes et de  $\text{CO}_2$ . Si on augmente le temps de barbotage il va avoir un plus de  $\text{SO}_2$ , des aldéhydes (qui seront oxydés en acides organiques) et du  $\text{CO}_2$  qui vont contribuer au titre et donc amener à surestimer la quantité réelle de  $\text{SO}_2$ .

APPAREILLAGE

L'appareil utilisé doit être conforme au schéma ci-dessous, principalement en ce qui concerne le réfrigérant :



L'air entraîne le  $\text{SO}_2$  (et d'autres substances volatiles) et passe dans la fiole « B » contenant l'eau oxygénée qui va dissoudre le  $\text{SO}_2$  et l'oxyder en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Le débit gazeux parcourant l'appareil qui doit être de 40 l/h environ est réglé au niveau de la pompe mais il pourrait être vérifié également par un débitmètre. Le tube d'amenée des gaz dans la fiole « B » est terminé par une plaque de verre fritté assurant la formation d'un très grand nombre de très petites bulles réalisant un bon contact des phases gazeuse et liquide.

## MODE OPERATOIRE

### *DOSAGE DU $\text{SO}_2$ LIBRE PAR ENTRAINEMENT A FROID*

#### **INUTILE d'allumer le réfrigérant !**

1. Remplir la burette avec  $\text{NaOH}$  0,01 N
2. Placer 3 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,3 vol) et quelques gouttes d'indicateur de Tashiro (Rouge de méthyle et bleu de méthylène) dans la fiole B. L'accrocher comme pour le  $\text{SO}_2$  total
3. Mettre **50 mL** de vin + **15 mL** d' $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 % dans le ballon rond A (250 mL). Après l'ajout de l'acide, accrocher le ballon immédiatement.
4. Allumer la pompe qui est réglée pour donner un débit d'environ 40 l/h soit 3 - 4 bulles par seconde

5. **Laisser barboter pendant 15 minutes exactement**
6. Retirer la fiole
7. Titrer le contenu avec NaOH 0,01 N (*virage au vert*)
8. Remettre la fiole sur le barboteur pendant 10 secondes afin de récupérer les éventuelles dernières gouttes de SO<sub>2</sub> provenant du vin acidifié (*virage au violet*)
9. Ajouter encore du NaOH jusqu'à ce que la solution redevienne verte (1-2 gouttes)

**Soit  $n_{\text{NaOH}}$  mL le volume de NaOH 0,01N versé.**

**A partir de l'équation  $N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} = N_{\text{SO}_2} \times V_{\text{SO}_2}$  :**

**Calculer la concentration en méq/l et en mg/L de SO<sub>2</sub> LIBRE**

**NB** : faire très attention à la contamination de la solution titrée de NaOH ; de concentration très faible (0,01 N) elle sera détitrée par la moindre goutte d'acide phosphorique

**DOSAGE DU SO<sub>2</sub> TOTAL PAR ENTRAINEMENT A CHAUD :**

1. Remplir la burette avec NaOH 0,01 N
2. Placer 3 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 vol.) et quelques gouttes d'indicateur de Tashiro (Rouge de méthyle et bleu de méthylène) dans la fiole B. L'accrocher comme indiqué en haut du réfrigérant
3. Si la couleur est violette (acide) neutraliser (coloration verte) avec 1-2 gouttes de NaOH 0,01 N (*burette*)
4. Placer la fiole B sur le barboteur come indiqué sur le schéma, en haut du réfrigérant. Mettre **20 mL de vin + 5 mL** d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % dans le ballon rond A (100 mL). Après l'ajout de l'acide, accrocher le ballon **immédiatement** comme indiqué su le schéma, en bas du réfrigérant. Allumer la pompe qui est réglée pour donner un débit d'environ 40 l/h soit 3 - 4 bulles par seconde
5. **Allumer le réfrigérant et ensuite** allumer la flamme et la placer directement sous le ballon
6. Laisser barboter pendant 15 minutes exactement
7. Arrêter la flamme avant de retirer la fiole
8. Titrer le contenu avec NaOH 0,01 N (*virage au vert*)
9. Remettre la fiole en place pendant 10 secondes afin de récupérer les éventuelles dernières gouttes de SO<sub>2</sub> provenant du vin acidifié (*virage au violet*)
10. Ajouter encore du NaOH jusqu'à ce que la solution redevienne verte (1-2 gouttes)

**Soit  $n_{\text{NaOH}}$  mL le volume de NaOH 0,01 N versé**

**Calculer la concentration en méq/L et en mg/L de SO<sub>2</sub> TOTAL**



10. Ajouter **20 mL** de NaOH 4N. Agiter une fois et laisser reposer 5 min
11. Ajouter 200 mL d'eau froide + 30 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%
12. Titrer immédiatement avec I<sub>2</sub> 0.05 N.
13. Soit  $n''$  mL le volume de I<sub>2</sub> versé pour ce dosage

Calculer la concentration (mg/L & éq/L) en SO<sub>2</sub> combiné et en SO<sub>2</sub> total

## REMARQUES

Pour les vins rouges **pauvres** en SO<sub>2</sub>, il y a intérêt à employer **de l'iode plus diluée**, par exemple 0,02 N. Remplacer alors le coefficient 32 par 12,8 dans les formules ci-dessus.

Si la quantité de SO<sub>2</sub> **avoisine ou dépasse la limite légale**, il convient de doser le SO<sub>2</sub> total par la méthode **type II**.

Lorsqu'on attache un intérêt particulier au dosage du SO<sub>2</sub> **libre**, il sera déterminé sur un échantillon maintenu pendant **4 jours** à l'abri de l'air à la température de 20 °C avant l'analyse.

Etant donné que certaines **substances sont oxydées** par l'iode en milieu acide, il est nécessaire (pour des dosages plus précis) d'évaluer la quantité d'iode ainsi utilisée. Pour cela, il faut combiner le dioxyde de soufre libre par un excès d'éthanal ou de propanal, avant le dosage. A 50 mL de vin placés dans une fiole conique de 300 mL, ajouter 5 mL de solution d'éthanal à 7 g/L ou 5 mL de propanal à 10 g/L. Boucher et laisser au repos 30 minutes au moins. Ajouter 3 mL d'acide sulfurique au 1/10 et titre avec de l'iode 0,05 N comme précédemment. Soit  $n'''$  mL le volume d'iode. Il doit être retranché de  $nI_2$  (dioxyde de soufre libre) et de  $nI_2 + n'I_2 + n''I_2$  (dioxyde de soufre total).

$n'''$  mL est généralement faible : 0,2 à 0,3 mL d'iode 0,05 N. Si le vin a été additionné d'acide ascorbique,  $n'''$  mL est beaucoup plus élevé et on peut, au moins approximativement, mesurer la quantité de ce produit par la valeur  $n'''$  mL, sachant que **1 mL d'iode 0,05 N oxyde 4,4 mg** d'acide ascorbique. Le mesure de  $n'''$  mL, on peut ainsi déceler les vins qui ont été additionnés d'acide ascorbique en quantité supérieure à 20 mL/l et qui ne s'est pas transformé en produits d'oxydant.

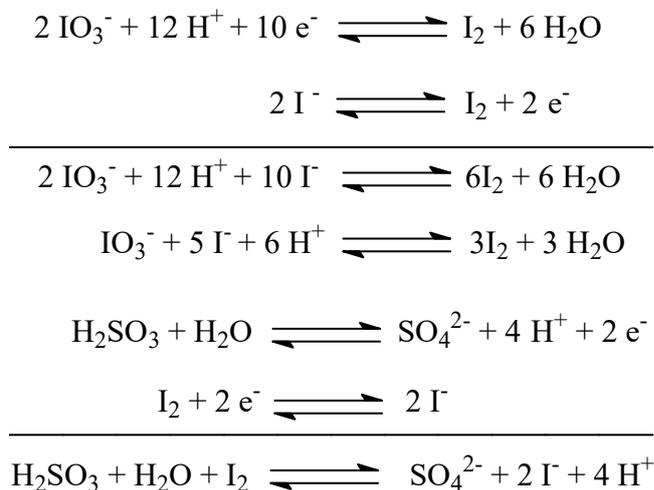
### 3.4.3 Dosage direct par méthode potentiométrique

#### PRINCIPE

Le dosage est une mesure potentiométrique avec des électrodes polarisées. Un circuit électronique crée une différence de potentiel (de l'ordre de 10 à 30 m V) entre deux électrodes de platine. Ce même circuit détecte les variations de la différence de potentiel avec une temporisation et commande une micro-électrovanne d'injection de la solution titrée d'iode ou d'iodure/iodate de potassium au moyen d'un embout calibré. Une agitation magnétique, avec un barreau anti-rebond, assure un mélange homogène.

C'est le dosage direct du SO<sub>2</sub> par l'iode ; l'iode est libéré, en milieu acide, à partir du mélange iodure-iodate de la solution de titration. Ce mélange présente l'avantage d'être particulièrement stable. La réaction s'écrit ainsi :

**Ensuite, le SO<sub>2</sub> est oxydé par l'iode en milieu acide selon la réaction suivante :**



La cathode est brusquement dépolarisée et l'aiguille du milliampèremètre reste fixe tant qu'il reste du dioxyde de soufre dans la solution. La fin de réaction est marquée par une soudaine déviation de l'aiguille.

## REACTIFS

Solution 1 : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1/3 en volume

Solution 2 : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1/10 en volume

Solution 3 : NaOH 2 N (80 g/L)

Solution 4 : Solution de titration KI – KIO<sub>3</sub> N/50

## MODE OPERATOIRE

### DOSAGE DU SO<sub>2</sub> LIBRE

1. Verser dans le bêcher **25 mL du vin**
2. Ajouter 5 mL d'acide sulfurique au 1/3
3. Effectuer le dosage en appuyant sur le bouton poussoir DEPART puis TITRATION. Le dosage terminé, l'appareil s'arrête automatiquement, la diode lumineuse rouge FIN s'allume

*1 mL de solution de titration KI/KIO<sub>3</sub> N/50 = 25,6 mg/L de SO<sub>2</sub> libre.*

**Répéter** ce dosage à **deux** autres reprises à des **moments différents** dans **une journée**  
Calculer la moyenne, l'écartype et le coefficient de variation entre les trois répétitions

### DOSAGE du SO<sub>2</sub> TOTAL

1. Verser dans le bêcher **10 mL du vin**
2. Ajouter 2 mL de NaOH 2 N. Laisser reposer 5 minutes
3. Ajouter 20 mL d'acide sulfurique au 1/10
4. Effectuer le dosage comme pour le SO<sub>2</sub> libre

*1 mL de solution de titration KI/KIO<sub>3</sub> = 64 mg/L de SO<sub>2</sub> total*

## REMARQUES

- Cette méthode de dosage simple du SO<sub>2</sub> suffit dans la pratique courante à partir du moment où les vins à analyser restent assez éloignés de leur limite légale en SO<sub>2</sub>. Dans le cas contraire, et pour une meilleure précision, il conviendra d'utiliser la méthode officielle type II.
- Pour une meilleure précision, dans les cas de vins rouges fortement colorés ou très tanniques et/ou vins additionnés d'acide ascorbique, il conviendra d'apporter une correction au SO<sub>2</sub> libre apparent en effectuant l'opération suivante :

Verser dans le bécher **25 mL de vin** à analyser

- Ajouter 5 mL de propanal
- Agiter et laisser reposer 15 minutes
- Ajouter 5 mL d'acide sulfurique au 1/3

Effectuer le dosage en appuyant sur le bouton poussoir DEPART puis TITRATION. Le dosage terminé, l'appareil s'arrête automatiquement, la diode lumineuse rouge FIN s'allume.

Lire sur la burette le volume de solution utilisée. Retrancher ce résultat de la valeur de SO<sub>2</sub> obtenue par simple dosage. Dans la pratique, pour les vins rouges fortement colorés ou très tanniques, on pourra faire une correction approximative en retranchant environ 6 mg/L de SO<sub>2</sub>.

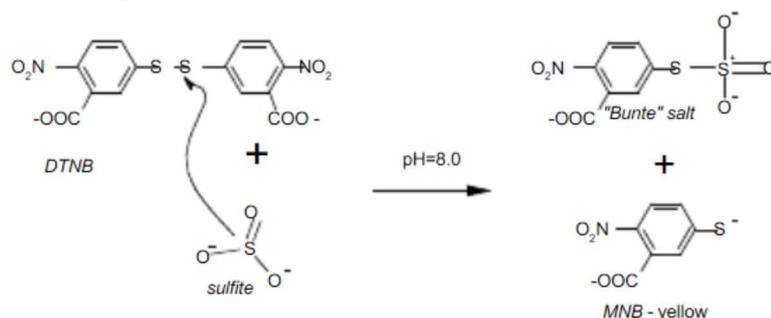
### 3.4.4 Dosage du SO<sub>2</sub> total par méthode spectrophotométrique

La méthode Frantz Paul fait intervenir une manipulation lourde et longue qui en limite l'utilisation pour les grandes séries. Les méthodes plus rapides (Ripper et potentiométrique) sont plus faciles de mettre en œuvre mais, dans le cas de Ripper, repose sur une observation subjective d'un virement de couleur ; ces méthodes ne se prêtent pas non plus aux dosages par des méthodes automatisées, couramment utilisées dans la grande majorité des laboratoires d'analyses œnologiques.

La méthode spectrophotométrique est simple, rapide et spécifique qui permet une automatisation rationnelle et couvre une gamme de mesure allant, pour les applications courantes, de 0 à 500 mg/L. La sensibilité est excellente y compris pour les valeurs faibles et les valeurs obtenues sont directement raccordables à celles données par la méthode de référence OIV

#### PRINCIPE

L'échantillon à doser est dilué dans une solution tampon phosphate de pH 8. Après stabilisation, le milieu de réaction reçoit une solution tamponnée de DTNB (5,5'-Dithiobis(2- nitrobenzoic acid) (3,3'-6) ou 3-Carboxy-4-nitrophenyl disulfide, («réactif d'Ellman»). Il s'agit d'un réactif spécifique permettant la modification et la détection quantitative des liaisons disulfites dont la formule développée est donnée ci-après :



Réactif 1 sert à ajuster le pH du milieu à 8, car la réaction n'aura lieu qu'un milieu alcalin. L'addition du réactif 2 contenant le DNTB est suivie d'une réaction colorée.

## MODE OPERATOIRE

Deux réactifs sont mis en œuvre :

### Réactif 1 tampon pH 8

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,4 % m/v. Le pH de la solution tampon ainsi préparée est ajusté par addition de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pur pour obtenir une valeur de 8 (écart maximum tolérable : ± 0,2 unité pH).

### Réactif 2

DNTB 760 mg

Réactif 1 900 mL

Ethanol pur 100 mL

Diluer le vin en fonction de la concentration en SO<sub>2</sub> TOTAL obtenue par une des trois autres méthodes telle façon que la concentration de l'échantillon ne dépasse pas 20 mg/L

Dans deux tubes à hémolyse ajouter :

	Témoin réactif	Dosage
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1	0
<b>Vin</b>	0	0.5
<b>Réactif 1</b>	1	1
<b>Attendre 2 minutes</b>		
<b>Réactif 2</b>	1	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2	2

Après **10 minutes** lire l'absorbance de l'échantillon à 440 nm, utilisant le témoin réactif comme blanc.

Utiliser la courbe de calibration (*sur le fichier Excel fourni*) pour déterminer la concentration en SO<sub>2</sub> total en mg/L et en éq/L.

***NB : si l'absorbance de votre échantillon dépasse celle du point le plus haut de la gamme, refaire la manipulation en diluant votre échantillon en deux***

---

**Calculer la moyenne, l'écartype et le coefficient de variation entre les valeurs obtenues par les 4 méthodes de dosage du SO<sub>2</sub> TOTAL et par les 3 méthodes pour le SO<sub>2</sub> LIBRE**

### 3.5 Sucres Résiduels

Le test de Benedict est un essai semi-quantitative qui permet d'estimer la concentration en sucres réducteurs possédant des fonctions cétones ou aldéhydes libres. Le réactif (souvent appelé solution qualitative de Benedict ou solution de Benedict) est un mélange de carbonate de sodium, de citrate de sodium et de sulfate de cuivre (II) pentahydraté. Il est utilisé à la place de la méthode de Fehling, qui, pour des faibles concentrations de sucres résiduels dans le vin, exige une étape délicate de préparation de l'échantillon (défécation) avant l'analyse.

#### Composition du réactif

Carbonate de sodium anhydre - 100 g

Citrate de sodium - 173 g

Sulfate de cuivre (II) pentahydraté 6 17,3 g

Le carbonate de sodium fournit les conditions alcalines qui sont requises pour la réaction redox. Le citrate de sodium se complexe avec les ions cuivriques pour éviter qu'il ne se dégrade pas pendant le stockage.

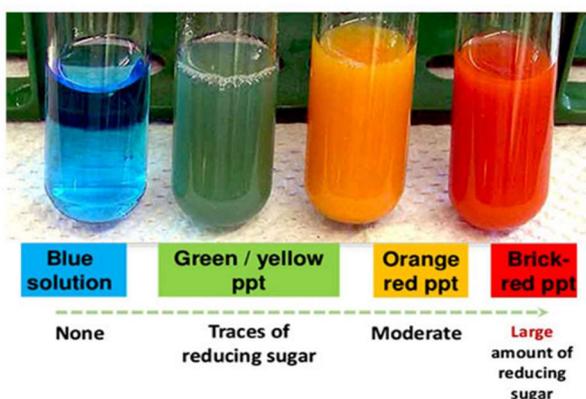
Un test positif avec le réactif de Benedict est indiqué par un changement de couleur du bleu clair au vert, orange, rouge ou rouge brique selon la concentration en sucres réducteurs. En effet, le sucre réducteur réduit les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) du réactif en ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ), qui précipite sous forme d'oxyde de cuivre(I) rouge insoluble ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ).

#### Méthode

- Diluer le vin au demi.
- Dans un tube à essai, mettre 1 mL de vin dilué et 2 ml de réactif de Benedict. Chauffer ensuite pendant 3 à 5 minutes.
- Observer le changement de couleur dans la solution la formation de précipité.

#### Interprétation

Aucune	< 0,5 g/L sucres résiduels
Verte	0,5 à 2,5 g/L
Orange	2,5 à 5 g/L
Rouge	5 à 7,5
Rouge brique	> 7,5





## SECTION 4 MICROBIOLOGIE

---

---

### 4.1 Introduction

Cet enseignement est organisé en deux grandes parties :

- l'apprentissage des **techniques de base de microbiologie** applicables à l'œnologie,
- **l'observation microscopique des micro-organismes** rencontrés au cours de la transformation du raisin en vin, à l'**état normal** et lors de **déviations microbiennes**.

#### Apprentissage des techniques de base de microbiologie

- notion de travail en conditions d'asepsie
- matériel et milieux de culture
- procédés de stérilisation
- examens microscopiques
- techniques d'isolement et de dénombrement de souches microbiennes
- filtration stérilisante d'un vin et mise en culture des bactéries lactiques
- procédés d'obtention de l'anaérobiose
- étude du type respiratoire des bactéries
- contrôle d'ambiance et observation microscopique de contaminants

#### ATTENTION !

Les bactéries à croissance rapide, utilisées pour cette partie de l'enseignement, **ne sont pas rencontrées en œnologie**, mais sont **pathogènes pour l'Homme**.

#### Observation des micro-organismes rencontrés en vinification

**Interprétation de culots** obtenus par centrifugation de **moût**, de **vin** ou de **vinaigre**, après examen microscopique:

- à l'état frais en présence de bleu de Méthylène
- sur frottis après coloration de Gram

## 4.2 Première séance

### 4.2.1 Isolement de germes à partir d'un échantillon poly-microbien (travail individuel)

#### Matériel :

- un tube (N° : ) renfermant un **bouillon** de culture, **non sélectif** (Trypticase Soja), ensemencé avec deux genres bactériens différents
- un **bec Bunsen** assurant les conditions d'**asepsie** et permettant de **stériliser** l'anse de platine **avant et après** utilisation
- une **anse de platine** permettant de prélever une **öse** d'échantillon
- une **boîte de Pétri** renfermant un milieu Trypticase Soja **gélifié, stérile**.

#### PRINCIPE

La **technique d'isolement** consiste à prélever une öse d'échantillon et à **épuiser cet inoculum sur un maximum de surface** du milieu gélifié, en réalisant des **stries très serrées**, selon la technique des **quartiers** ou celle des **quadrants** (démonstration). Le but étant de parvenir à **séparer les bactéries** de manière à obtenir, après **croissance** par **incubation à 37°C**, des **colonies isolées** correspondant à des **clones purs** pour chaque type bactérien présent dans l'échantillon initial.

### 4.2.2- Numération directe / dénombrement de levures: travail en groupe (4 ou 5)

**But :** déterminer la **concentration en levures totales**, estimer le **% de viabilité**, **dénombrer les viables cultivables**, évaluer le **% de viables non cultivables (VNC)**.

**Matériel et techniques :** (cf. fiches)

A partir d'un bouillon Sabouraud numéroté (N° : ), renfermant une culture de *Saccharomyces cerevisiae*, réaliser une **gamme de dilution** et effectuer :

- une numération **microscopique directe** en présence de **bleu de Méthylène**. Interpréter les résultats.
- un **dénombrement** sur milieu **Sabouraud gélifié, glucosé**

4.2.3 Contrôle d'ambiance : un par pailleasse  
sur milieu Sabouraud gélifié, glucosé

4.2.4 Analyse d'un vin (N° : ): travail en groupe (4 ou 5)

Recherche de *Brettanomyces* par ensemencement d'un **Sniff'Brett**

**Filtration stérilisante** et mise en culture des **bactéries lactiques sur milieu MRS**. Incubation sous **anaérobiose à 30°C**.

## 4.3 Deuxième séance

### 4.3.1 à partir de la boîte d'isolement des bactéries :

- observation des **colonies** obtenues
- confection d'un **frottis et coloration de Gram** (cf. fiche) à partir des **2 types** de colonies
- observation microscopique (objectif à immersion : x100)

### 4.3.2 Observation de levures à partir de bouillons de culture

Par examen à l'**état frais**, en présence de **bleu de Méthylène** :

- observer les différences morphologiques entre les populations de *Saccharomyces* et *Brettanomyces*
- évaluer la viabilité et la vitalité des levures

### 4.3.3 Observation de moûts non fermentés :

Par examen à l'**état frais**, en présence de **bleu de Méthylène** :

- *observer les morphologies des différents types de levures*
- *repérer la présence de bactéries*

Après confection d'un frottis et **coloration de Gram**

- *différencier les levures des bactéries*
- *observer la forme, les arrangements et le Gram des bactéries*

## 4.4 Troisième séance

### 4.4.1 Lecture du dénombrement de levures

Interprétation globale, en tenant compte des résultats obtenus, à la première séance, par numération microscopique directe

### 4.4.2 Première lecture Sniff Brett: interprétation

### 4.4.3 Commentaire fiches techniques

### 4.4.4 Observation d'échantillons concentrés de moût, vin, vinaigre

- à l'**état frais** en présence de **bleu de Méthylène**
- après confection d'un frottis et **coloration de Gram**

## 4.5 Quatrième séance

### 4.5.1 Observation de bactéries lactiques

à partir de la mise en culture en anaérobiose sur **milieu MRS**

### 4.5.2 Observation de contaminants à partir des contrôles d'ambiance

### 4.5.3 Deuxième lecture Sniff'Brett: interprétation

### 4.5.4 Observation de culots de centrifugation de moût, vin, vinaigre

-à l'état frais en présence de **bleu de Méthylène**

-après confection d'un frottis et **coloration de Gram**

## 4.6 Fiches techniques

### 4.6.1 Examen d'un frottis après fixation et coloration de Gram

**C'EST LA TECHNIQUE DE CHOIX POUR OBSERVER LES BACTÉRIES.** Les levures apparaissent généralement violet foncé (parfois rose), mais ne sont pas concernées par la classification de Gram.

#### **CONFECTION D'UN FROTTIS**

À l'aide de l'anse de platine, étaler une öse d'échantillon sur 1 à 2 cm de surface d'une lame propre, décapée à la flamme et refroidie. **Laisser bien sécher le frottis avant de le fixer.** Repérer le contour du frottis à l'aide d'un marqueur sur le dessous de la lame.

#### **FIXATION PAR LA CHALEUR**

En maintenant la lame à l'aide d'une pince, la passer 3 fois dans la flamme en écrasant bien le cône bleu de la flamme stérilisante. Le frottis ne doit pas être au contact direct de la flamme.

**But de la fixation** : tuer les bactéries, figer leur structure dans un état proche de celui du vivant et les faire adhérer à la lame. **Laisser refroidir la lame** avant de procéder à la coloration.

#### **PRINCIPE DE LA COLORATION DE GRAM**

La coloration de Gram est à l'origine de la **classification des bactéries**. C'est une **coloration cytoplasmique**, basée sur la **différence de structure de la paroi** qui conditionne la **perméabilité aux solvants organiques**.

Dans un premier temps, le **complexe cristal violet / lugol** (réactif iodo-ioduré) pénètre dans toutes les bactéries et **colore le cytoplasme en violet**.

L'étape suivante consiste à soumettre les bactéries à l'action d'un mélange **alcool-acétone** possédant une **forte affinité pour les lipides et capable de les solubiliser**. **Seules les bactéries à Gram négatif, dont la paroi renferme des lipides** (membrane externe), laissent pénétrer le mélange alcool-acétone et **se décolorent**. Les bactéries à **Gram positif** restent colorées en **violet**.

La dernière étape permet de **colorer en rose les bactéries à Gram négatif** à l'aide de la fuchsine de Ziehl ou de la **safranine**.

**Rq** : les précipités protéiques apparaîtront rose à violet

## TECHNIQUE

- recouvrir le frottis de **crystal violet** (violet de Gentiane), laisser agir **1 mn**
- rincer et recouvrir de **lugol**, laisser agir **1 mn**
- rincer puis décolorer à l'**alcool-acétone** et bloquer immédiatement l'action des solvants par rinçage à l'eau
- bien égoutter et recouvrir de **safranine** laisser agir **1 mn** et rincer
- bien laisser sécher avant de déposer une petite goutte d'huile « de cèdre »

### Conditions d'observation microscopique:

**Objectif x100** à immersion : soit un grossissement final de x1000

Condenseur : en position haute

Diaphragme : ouverture maximale

### 4.6.2 Examen à l'état frais en présence d'un colorant vital

C'est la technique de choix **pour observer les levures**. De par leur petite taille, les bactéries sont difficilement observables dans ces conditions.

Le **colorant vital** utilisé en TP est le **Bleu de Méthylène à 1 ‰**

### MONTAGE DE LA PREPARATION:

Sur une lame propre, déposer une petite goutte de bleu de Méthylène et une goutte de culot à l'aide d'une pipette Pasteur. Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air et les débordements liquidiens.

### CONDITIONS D'OBSERVATION MICROSCOPIQUE

- **objectif x40** : soit un grossissement final de : x 400
- condenseur : en position basse
- diaphragme : ouverture minimale

### INTERPRETATION

Les **levures viables excluent le bleu de Méthylène**: elles apparaissent **réfringentes** (transparentes, jaunâtres à grisâtres).

Les levures ayant perdu leur intégrité membranaire (**mourantes ou mortes**) laissent pénétrer le colorant et le concentrent dans leur cytoplasme : elles apparaissent **bleu foncé**.

**NB** : les **précipités amorphes** du vin (protéines, acides organiques) peuvent également fixer le bleu de Méthylène. Il est important de bien faire la **mise au point sur les levures**, surtout lorsqu'elles apparaissent sur un **fond riche en sédiments** et donc **coloré en bleu**,

### INTERET

Ce procédé permet d'estimer le **pourcentage de viabilité** d'une population de levures à partir d'un **culot de moût ou de vin**.

**Rq** : parmi les levures viables, certaines ont perdu la capacité de se multiplier. Elles sont dites **viables non cultivables (VNC)** car elles ne donnent pas de colonies après mise en culture sur milieu gélosé.

Il permet également d'évaluer la **vitalité** de la population qui peut être :

- **forte** : cellules en multiplication (**bourgeoisement** important)
- **faible** : cellules **quiescentes**

Enfin cette technique, lorsqu'elle est réalisée à l'aide d'un **hématimètre**, rend possible la numération microscopique directe et, par conséquent, la détermination de la **concentration de levures**, exprimée en nombre de levures/mL d'échantillon (cf. dénombrement microbien).

#### 4.6.3 Dénombrement microbien

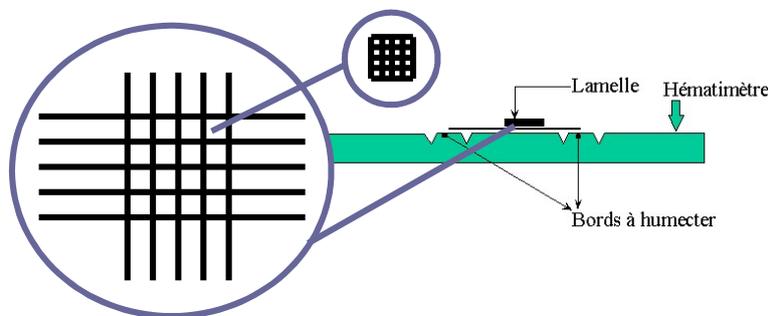
A partir de l'échantillon de départ, réaliser une **gamme de dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$**  en eau distillée stérile et **dénombrer les levures présentes** :

*1- par numération microscopique directe:*

#### **O HEMATIMETRE DE REFERENCE : CELLULE DE THOMA**

Un hématimètre (ou cellule de numération) est une épaisse lame de verre qui inclut, à sa surface, un **quadrillage** gravé facilitant la numération. Afin de délimiter un **volume connu** permettant de calculer la **concentration de levures**, on fait adhérer une **lamelle spéciale** en humectant les bords rodés de l'hématimètre. L'échantillon est déposé sous la lamelle et doit recouvrir toute la surface sans déborder dans les rigoles.

La numération s'effectue dans les limites de la partie centrale composée de **16 grands carrés, chacun constitué de 16 petits carrés**



#### **O LAME DE NUMERATION : KOVA (HYCOR)**

Ce type de lame, comporte 10 cupules individuelles et quadrillées, ce qui facilite les examens de routine.

Chaque dilution de l'échantillon est déposée dans une cupule numérotée à l'aide d'une P20, puis observée à l'**objectif x10** et **x40** (cf. conditions d'observation à l'état frais)

La grille de numération correspond à un volume de  $0,9 \mu\text{l}$  et comprend 90 petits carrés ( $0,01 \mu\text{l}$ ). **Le dénombrement s'effectue sur 10 petits carrés** représentatifs d'une répartition homogène des levures et correspondant à un **volume de  $0,1 \mu\text{l}$  ( $10^{-4}$  mL)**

L'utilisation du **bleu de Méthylène** (dilution au  $\frac{1}{2}$  de l'échantillon) permet, en outre, de différencier les levures **viables (réfringentes)** des levures **mortes (bleues)**.

On peut ainsi calculer la **concentration de levures viables** de l'échantillon de départ:

$$N = n \text{ viables} \times \text{inverse de la dilution} \times 2 \times 10^4 \text{ levures / mL}$$

Ex : n viables = 15 pour la dilution  $10^{-3}$  diluée au 1/2 en bleu de Méthylène

$$N = 15 \times 10^3 \times 2 \times 10^4 = 3.10^8 \text{ levures/mL}$$

## *2- par étalement sur boîte de milieu gélosé et mise en culture*

Un **volume connu** (0,1 mL) de **chaque dilution** est étalé (à l'aide d'un râteau) à la surface d'une boîte de **gélose Sabouraud**, jusqu'à absorption complète du liquide par le milieu.

Les boîtes sont incubées à **30°C** (couvercle en bas).

Chaque levure déposée sur la gélose va se multiplier pour donner naissance à une **colonie** ou clone ou UFC (unité formant colonie) bien visible après **48 h de culture**.

Le **dénombrement des colonies** permet donc de déduire le nombre **N'** de levures, présentes au départ par mL d'échantillon et capables de se développer après mise en culture.

Autrement dit, **N'** équivaut à la **concentration initiale de levures viables et cultivables**.

$$N' = n \times \text{inverse de la dilution} \times 10 \text{ levures/mL}$$

ex : n = 20 pour 0,1 mL de la dilution  $10^{-6}$

$$N' = 20 \times 10^6 \times 10 = 2.10^8 \text{ levures/mL}$$

## **INTERPRETATION COMPARATIVE DES DEUX TECHNIQUES :**

**si  $N \approx N'$** : toutes les **levures viables** sont **capables de croissance**

**si  $N \gg N'$** : la différence représente la concentration de **levures viables non cultivables (VNC)**

## **RESULTATS OBTENUS POUR L'ECHANTILLON N° :**

**Concentration en levures totales :**

**Concentration en levures viables :**

**% de viabilité :**

**Concentration en levures cultivables :**

**Concentration en VNC :**

#### 4.6.4 Procédés de stérilisation

**CHALEUR SECHE: FOUR PASTEUR 180°C PENDANT 30 mn**

—————> Verrerie et objets métalliques

**CHALEUR HUMIDE: AUTOCLAVE 120°C PENDANT 20 mn**

- >
- plastiques thermorésistants
  - caoutchouc
  - milieux de culture non altérables par la chaleur
  - décontamination du matériel

**FILTRATION SUR MEMBRANE (TYPE MILLIPORE) :**

Ø des pores: 0,22 ou 0,45 µm

—————> Liquides thermolabiles

**TYNDALLISATION: CHAUFFAGE ≥ 56°C, 1h / JOUR PENDANT 3 A 7 JOURS**

Procédé favorisant l'éclosion et la **germination des spores.**

**Les formes végétatives** ainsi obtenues sont **plus sensibles à la chaleur.**

—————> Substances thermolabiles non filtrables

**GAZ TOXIQUES: OXYDE D'ETHYLENE**

—————> Matières plastiques thermolabiles

**RADIATIONS UV**

—————> Désinfection des surfaces

**ANTISEPTIQUES : EAU DE JAVEL, FORMOL ...**

—————> Désinfection des locaux  
Décontamination du matériel

#### 4.6.5 Moyens d'obtention de l'anaérobiose

**ELIMINATION DE L'O<sub>2</sub> DE L'AIR PRESENT DANS UNE ENCEINTE FERMEE**

- par introduction d'un **mélange gazeux (CO<sub>2</sub> , H<sub>2</sub> , N<sub>2</sub>)** sous pression, **après avoir fait le vide** dans l'enceinte
- par utilisation d'un **générateur chimique d'anaérobiose** (mélange à base d'**ascorbate** et de **charbon activé**) capable d'**absorber l'O<sub>2</sub>** et de **libérer du CO<sub>2</sub>** .

**ELIMINATION DE L'O<sub>2</sub> DISSOUS DANS LES MILIEUX DE CULTURE**

Par **immersion dans un bain-marie bouillant** = procédé de **régénération** des milieux.

**DIMINUTION DU POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION** des milieux de culture par addition de **substances réductrices** : glucose, thioglycolate, cystéine.

**OPPOSITION A LA PENETRATION D'AIR** dans les milieux de culture liquides

- par ajout d'**huile de paraffine** à la surface des tubes.
- par **incorporation de gélose ou agar** (2 g /L) : pour augmenter la consistance des milieux dits « semi-solides ».

### **Possibilité de combiner différents procédés**

#### **4.6.6 Etude du type respiratoire des bactéries**

Utilisation du **milieu VF** (viande-foie) **glucosé, gélosé**, préalablement liquéfié et **régénéré** par immersion dans un bain-marie bouillant et maintenu liquide (à 50°C) jusqu'à ensemencement.

La **suspension bactérienne**, prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur « boutonnée », est **inoculée sur toute la hauteur et la surface du tube**. Une prise en gel rapide du milieu évite la sédimentation des bactéries.

Après incubation, la **localisation de la croissance bactérienne** permet de définir **quatre types respiratoires différents** :

##### **1 L'AEROBIOSE STRICTE:**

Les bactéries **aérobies strictes** ne se développent qu'en **présence d'oxygène à la surface** du milieu. Leur **métabolisme** est de type **oxydatif**

##### **2 LA MICRO-AEROPHILIE:**

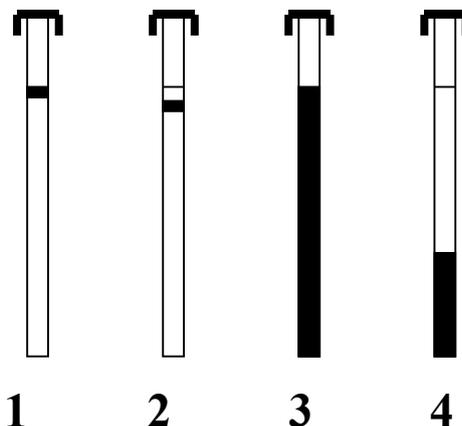
Les bactéries **micro-aérophiles** supportent une **tension en oxygène légèrement inférieure à la pression atmosphérique**. Elles se développent juste **au-dessous de la surface** du milieu

##### **3 L'AEROBIOSE- ANAEROBIOSE FACULTATIVE:**

Les bactéries **aéro-anaérobies facultatives** poussent sur **toute la hauteur du tube**, aussi bien en présence d'oxygène : **métabolisme oxydatif**, qu'en son absence : **métabolisme fermentaire**

##### **4 L'ANAEROBIOSE STRICTE:**

Les bactéries **anaérobies strictes** sont **incapables de se développer en présence d'oxygène**, toxique pour elles. Leur croissance est observée en **profondeur** du milieu.





## SECTION 5 ANALYSES SPECIFIQUES DES VINS ROUGES

---

---

### 5.1 Composés phénoliques

#### 5.1.1 Indice de Polyphénols Totaux (IPT) (Absorbance à 280 nm)

Il s'agit de la mesure de l'absorption dans l'ultraviolet. Le vin rouge est généralement dilué 100 fois et l'absorbance est mesurée à 280 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique. Le résultat est exprimé par un indice :

$$IPT = Absorbance \times dilution$$

L'indice de Folin et celui-ci varient en général dans le même sens et ont des valeurs comparables.

#### 5.1.2 Couleur et caractéristiques chromatiques

Les spectres des vins rouges jeunes présentent un maximum d'absorption à 520 nm (caractéristique de la couleur rouge) et un minimum vers 420 nm (caractéristique de la couleur jaune), et une absorption non négligeable à 620 nm (caractéristique du mauve).

Les spectres des vins blancs ne présentent pas le maximum défini seulement une légère absorption vers 420 nm, en fonction de la couleur.

Pour caractériser la couleur, il a été défini des coefficients faisant intervenir les absorbances à ces longueurs d'onde.

#### **L'INTENSITE COLORANTE (IC)**

C'est la somme des absorbances sous 1 mm de trajet optique pour les radiations de longueurs d'onde égales à 420 et 520 nm, par rapport à l'eau distillée.

#### **L'INTENSITE COLORANTE (IC')**

C'est la somme des absorbances sous 1 mm de trajet optique pour les radiations de longueurs d'onde égales à 420, 520 et 620 nm, par rapport à l'eau distillée.

#### **LA TEINTE**

C'est le rapport de l'absorbance à 420 nm ( $A_{420}$ ) et de celle à 520 nm ( $A_{520}$ ). Elle représente la proportion de couleur jaune par rapport à la couleur rouge.

La **teinte** est donnée par : 
$$N = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

Au cours du vieillissement, du vin,  $A_{520}$  diminue,  $A_{420}$  est constant, donc le rapport augmente ; la teinte du vin jeune est faible (0,5 à 0,6) et celle du vin vieux peut dépasser 1 (1,2 – 1,3).

## CONTRIBUTION DE CHAQUE COLORATION A LA COULEUR DU VIN

$$\text{Jaune : } A_{420} (\%) = \frac{A_{420}}{IC'}$$

$$\text{Rouge : } A_{520} (\%) = \frac{A_{520}}{IC'}$$

$$\text{Mauve : } A_{620} (\%) = \frac{A_{620}}{IC'}$$

La **forme du spectre** ( $A\%$ ) qui indique l'aspect rouge de la couleur est :

$$A\% = 1 - \frac{A_{420} + A_{620}}{2 \times A_{520}} \times 100$$

En tendance générale,  $A\%$  diminue avec le vieillissement du vin.

### 5.1.3 Indice de Folin Ciocalteu

#### PRINCIPE

Cette méthode est basée sur l'emploi du réactif de Folin Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La réaction se produit en milieu alcalin.

La coloration bleu produite possède une absorption maximum aux environs de 700 nm ; elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

Pour les moûts et vins mutés il faut effectuer une séparation préalable sur Sephadex afin d'éliminer les sucres.

#### MODE OPERATOIRE

Le vin rouge doit être dilué 1/5<sup>ème</sup> tandis que le vin blanc n'a pas besoin d'être dilué.

Dans une fiole jaugée de 100ml :

1. Placer 1 ml de vin rouge dilué au 1/5<sup>ème</sup> ou 1 ml de vin blanc
2. Ajouter 5 ml de réactif
3. Ajouter 60 ml d'eau distillée (pour réduire l'acidité qui pourrait provoquer la formation d'un précipité de carbonate).
4. Ajouter 20 ml de solution de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  (20%) car l'oxydation se fait en milieu alcalin doux

5. Compléter au trait de jauge (100 ml) avec de l'eau distillée
6. Attendre 30 min pour une stabilisation de la réaction
7. Lire l'absorbance à 700 nm sous 1 cm d'épaisseur **en utilisant comme blanc de l'eau traité de la même façon que le vin**

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un indice, obtenu en multipliant l'absorbance par 100 pour le vin rouge et par 20 pour le vin blanc :

$$\begin{aligned} \text{Indice de Folin Ciocalteu} &= A_{700} \times 20 \quad \text{pour le vin blanc} \\ &= A_{700} \times 100 \quad \text{pour le vin rouge} \end{aligned}$$

Avec cette méthode, on obtient des indices de phénols totaux compris entre 5 et 15 pour les vins blancs, entre 10 et 15 pour les vins rosés, entre 25 et 50 pour les vins rouges, entre 55 et 70 pour les vins de presse.

#### **5.1.4 Dosage des tanins totaux**

##### **PRINCIPE**

Les tanins du vin rouge sont constitués de chaînes de flavanols (procyanidines) plus ou moins polymérisés, soit de façon homogène, avec un enchaînement régulier, soit de façon hétérogène par différentes liaisons. Dans tous les cas, le chauffage en milieu acide de ces molécules conduit à la rupture de certaines liaisons et à la formation de carbocations qui se transforment partiellement en cyanidine si le milieu est suffisamment oxydant (réaction de Bate-Smith). Cette propriété est utilisée depuis longtemps (Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1966), avec de conditions définies pour le dosage des tanins (méthode *LA*).

##### **MODE OPERATOIRE**

Le vin doit être dilué 1/50<sup>ème</sup>.

On prépare deux échantillons contenant :

1. 4 ml de vin dilué au 1/50<sup>ème</sup> + 2 mL d'H<sub>2</sub>O + 6 mL d'HCl pur (12 N)
2. Un des 2 tubes est chauffé au bain marie à 100 °C pendant 30 minutes
3. Laisser refroidir le tube chauffé et ajouter 1 mL d'éthanol à 95 % dans les 2 tubes
4. Mesurer l'absorbance des deux tubes à 520 et 550 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique

La concentration en tanins totaux *LA*, en g/L, est donnée en reportant la différence d'absorbance à une courbe étalon tracée à partir d'oligomères procyanidiques de référence. On obtient la concentration :

$$LA \left( \frac{g}{L} \right) = 19,33 \times \Delta A_{550}$$

Bien que très reproductible et facile à mettre en œuvre, cette méthode donne un résultat très approché, car elle ne tient pas compte de l'incidence des différentes structures présentes dans le vin, de leur degré de polymérisation et des autres constituants du vin qui interfèrent dans le dosage. On a souvent une surestimation de la concentration en tanins des vins et il n'est pas rare de constater une augmentation du résultat de ce dosage au cours du vieillissement du vin ; elle ne peut pas correspondre à une augmentation des tanins.

A partir de ces observations, Glories (1988) a mis au point deux méthodes de calcul de la concentration en tanins des vins ; la mise en œuvre du dosage, LA, reste identique.

La première prend en compte la participation des différents groupes de molécules à la réaction, LA.

Elle aboutit à deux équations :

$$\text{Pour les vins jeunes : } C_1 \left( \frac{g}{L} \right) = 16,16 \times A_2 - 24,24 \times A_1 + 1,71 \times A_l$$

$$\text{Pour les vins vieux : } C_1 \left( \frac{g}{L} \right) = 16,16 \times A_2 - 33,32 \times A_1 + 3,86 \times A_l$$

Avec :  $A_1$  = absorbance à 520 nm sans chauffage, sous un parcours optique de 10 mm,

$A_2$  = absorbance à 520 nm avec chauffage, sous un parcours optique de 10 mm,

$A_l$  = concentration en anthocyanes libres en g/L.

La seconde méthode de calcul de la teneur en tanins est basée sur la considération du spectre visible de la réaction, LA. On observe, quel que soit le degré de polymérisation des procyanidines et leur concentration, les relations suivantes, dans lesquelles  $\Delta A_{520}$ ,  $\Delta A_{470}$  et  $\Delta A_{570}$  représentent la différence de DO, avec ou sans chauffage, pour les trois longueurs d'onde correspondant :

$$\Delta A_{520} = 1,1 \times \Delta A_{470} \quad \text{et} \quad \Delta A_{520} = 1,54 \times \Delta A_{570}$$

En fonction de la présence de substances parasites, la réaction est amplifiée, soit vers les grandes longueurs d'onde (mauve), soit vers les courtes longueurs d'ondes (orange jaune). Les  $\Delta A_{520}$  mesurés et calculés, à partir de  $\Delta A_{470}$  et  $\Delta A_{570}$ , sont alors différentes. On se trouve en présence de trois valeurs possibles pour  $\Delta A_{520}$  ; on prend en compte la valeur initiale, censée représenter au mieux la transformation exclusive des procyanidines.

Par comparaison avec une solution de procyanidines oligomères issues de pépins de raisin, on obtient la concentration en tanins par la relation :

$$C_2 \left( \frac{g}{L} \right) = 15,7 \times \Delta A_{520}$$

Les deux méthodes de calcul donnent des résultats voisins et toujours inférieurs à ceux obtenus avec la méthode originelle, LA.

### **5.1.5 Indice HCl**

#### **PRINCIPE**

L'indice HCl ( $I_{HCl}$ ) est basé sur l'instabilité des procyanidines en milieu HCl fort ; la vitesse de précipitation est fonction du degré de polymérisation.

#### **MODE OPERATOIRE**

Le mode opératoire comprend le mélange, dans un tube à centrifuger, de :

1. 10 mL de vin + 15 mL d'HCl (12N) + 5 mL d'eau
2. Agiter
3. On dilue immédiatement le mélange précédent au 1/30<sup>ème</sup> (667 µl dans 20 ml de volume final) et on fait une mesure instantanée de l'absorbance  $A_0$  à 280 nm sous 1 cm de parcours optique
4. On effectue la même opération (3.) à l'issue de 7 heures d'attente et après centrifugation (5 minutes à 3000 tr/min) ; on obtient une nouvelle valeur  $A_1$ .

L'indice HCl est donné par la relation :

$$I_{HCl} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Les valeurs sont comprises entre 5 et 40 ; au-delà de 35 à 40, les tanins du vin précipitent ce qui entraîne une diminution de l'indice. En début de l'élevage, un vin très léger présente un indice faible de 5 à 10 ; un vin de garde a un indice de 10 à 25 ; un vin très chargé en composés phénoliques, souvent polymérisés, a un indice supérieur à 25. L'indice HCl est donc un reflet de l'état de polymérisation des tanins du vin qui est lui-même fonction des conditions d'évolution. Par exemple, il diminue après les froids de l'hiver, après le collage et pendant le vieillissement en bouteille quelques années après le conditionnement.

### **5.1.6 Indice de gélatine**

#### **PRINCIPE**

Il est basé sur la propriété des tanins de réagir avec les protéines, formant avec elles des combinaisons stables. Les tanins condensés présents dans le vin précipitent avec la gélatine de façon homogène et reproductible. L'indice de gélatine ( $I_{Gélatine}$ ) (Glories, 1974 et 1978) met en évidence la capacité de réaction des tanins du vin avec les protéines de la gélatine. Cette réactivité intervient dans la sensation d'astringence que communique la dégustation du vin rouge. La « gélatine soluble » utilisée présente toute une gamme de protéines de masses moléculaires très différentes (5000 à 300 000).

#### **MODE OPERATOIRE**

Le mode opératoire consiste à ajouter :

1. 50 mL de vin rouge + 5 ml de gélatine soluble à froid (70 g/L).

2. Après trois jours, on centrifuge (5 minutes à 3000 tr/min) et on dose les **tanins LA**, du surnageant dilué au 1/50<sup>ème</sup>.

On obtient une teneur en tanins  $C_1 \left(\frac{g}{L}\right)$ ;  $C_0$  est la concentration en tanins du témoin, avant le traitement à la gélatine. L'indice de gélatine est donné par la relation :

$$I_{Gélatine} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

Les valeurs varient de 25 à 80, selon l'origine des vins et leur mode de vinifications. Une valeur élevée, supérieure à 60, indique la présence de tanins très réactifs, pouvant être responsables de dureté voire d'astringence. Une valeur faible, inférieure à 35 ou 40, dénote une absence de charpente et peut être à l'origine de la sensation de creux et d'amertume. Les valeurs moyennes, 40 à 60, qui montrent une réactivité des tanins, peuvent caractériser aussi bien des vins souples et pleins, que des vins durs et maigres.

### 5.1.7 Indice de dialyse

#### **PRINCIPE**

Il est en relation avec la structure spatiale des tanins. Les molécules encombrantes ou très chargées traversent les pores d'une membrane de dialysante, plus lentement que les petites molécules peu chargées.

#### **MODE OPERATOIRE**

1. Placer 10 mL de vin dans un boudin de cellophane ; ils sont dialysés par rapport à 100 mL de solution synthétique (5 g.L<sup>-1</sup> acide tartrique, pH 3,2, 12 % EtOH)
2. Agiter manuellement deux fois par jour pendant trois jours
3. Après dilution au 1/10<sup>ème</sup> avec de l'eau, on mesure l'absorbance sur le dialysat ( $A_1$ ) à 280 nm, sous 1 cm de parcours optique. Une mesure identique ( $A_0$ ) est effectuée sur le vin témoin dilué au 1/100<sup>ème</sup>.

$$I_{Dialyse} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

**NB** : la deuxième mesure ( $A_0$ ) après dilution du vin au 1/100<sup>ème</sup> constitue l'*IPT* du vin. Elle n'est pas à refaire ici si elle a déjà été réalisée sur le vin.

Les valeurs sont comprises entre 5 et 30, mais ne sont pas forcément en relation directe avec celles de l'indice HCl. Des vins riches en procyanidines provenant de pépins peuvent présenter un indice HCl élevé (25) et un indice de dialyse faible (10). Par contre, un indice de dialyse élevé (25) met en évidence des pigments encombrants, généralement polymérisés et caractérisés par un indice HCl également élevé (20 à 30). Dans certains cas, mettant en jeu la richesse particulière en anthocyanes, l'indice HCl peut être faible (10), malgré un indice de dialyse élevé.

### 5.1.8 Dosage des anthocyanes

#### PRINCIPE

Les anthocyanes totales,  $A_t$ , se trouvent dans le vin sous plusieurs formes : les anthocyanes à l'état libre,  $A_l$  et les anthocyanes combinées aux tanins  $A_c$ , dont une fraction est décolorable par le  $\text{SO}_2$ ,  $TA$ , et l'autre insensible à ce réactif,  $TAT$  :

$$A_t = A_l + A_c = A_l + TA + TAT$$

Aucune méthode ne permet de doser correctement  $A_t$  ; seule une estimation peut être envisagée. Par contre,  $A_l + TA = A_s$  peut être déterminée globalement, à l'aide de méthodes chimiques et chromatographiques.

Les méthodes chimiques sont basées sur les propriétés caractéristiques des anthocyanes : variation de couleur en fonction du pH et décoloration par le dioxyde de soufre (Ribéreau-Gayon et Stonestree, 1965).

#### MODE OPERATOIRE

On prépare la solution suivante :

1. 1 ml de vin.
2. 1 mL d'éthanol à 0,1 % d'HCl.
3. 20 mL d'HCl à 2 % (pH = 0,8).

Dans deux tubes à essais, on place 10 mL de la solution précédente auxquels on ajoute, dans le premier 4 mL d'eau distillée et dans le second 4 mL d'une solution d'hydrogénosulfite de sodium à 15 % (solution du commerce  $d = 1,24$  diluée au  $\frac{1}{2}$ ).

La décoloration est pratiquement instantanée, cependant, on mesure les absorbances après 20 minutes d'attente. Ces mesures sont faites à 520 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique.

La concentration en mg/L est donnée en reportant la différence des absorbances à une courbe étalon tracée à partir d'anthocyanes de référence :

$$A_l + TA = C \left( \frac{mg}{L} \right) = 875 \times \Delta A_{520}$$

### **5.1.9 Dosage des anthocyanes libres, faiblement polymérisés & condensés**

#### **PRINCIPE**

Par chromatographie liquide-solide sur colonne, on sépare 3 fractions de la matière colorante constituée par :

- les anthocyanes libres (monomères),
- les formes faiblement polymérisées (polymères rouges),
- les formes condensées (polymères jaunes et bruns).

#### **REACTIFS**

On commence par préparer le mélange d'adsorbants. Dans un ballon de verre pyrex, on mélange et on homogénéise :

- 20 g de Polyclar AT (polyvinylpolypyrrolidone) de MERCK,
- 10 g de gel de silice G, pour chromatographie sur couche mince, de MERCK
- 70 g de gel de silice 60 (diamètre 0,063 à 0,2 mm) pour chromatographie sur colonne de MERCK.

Ce mélange est traité par un excès d'HCl 12 N bouillant pendant 30 minutes puis, après refroidissement, lavé par l'eau jusqu'à neutralité.

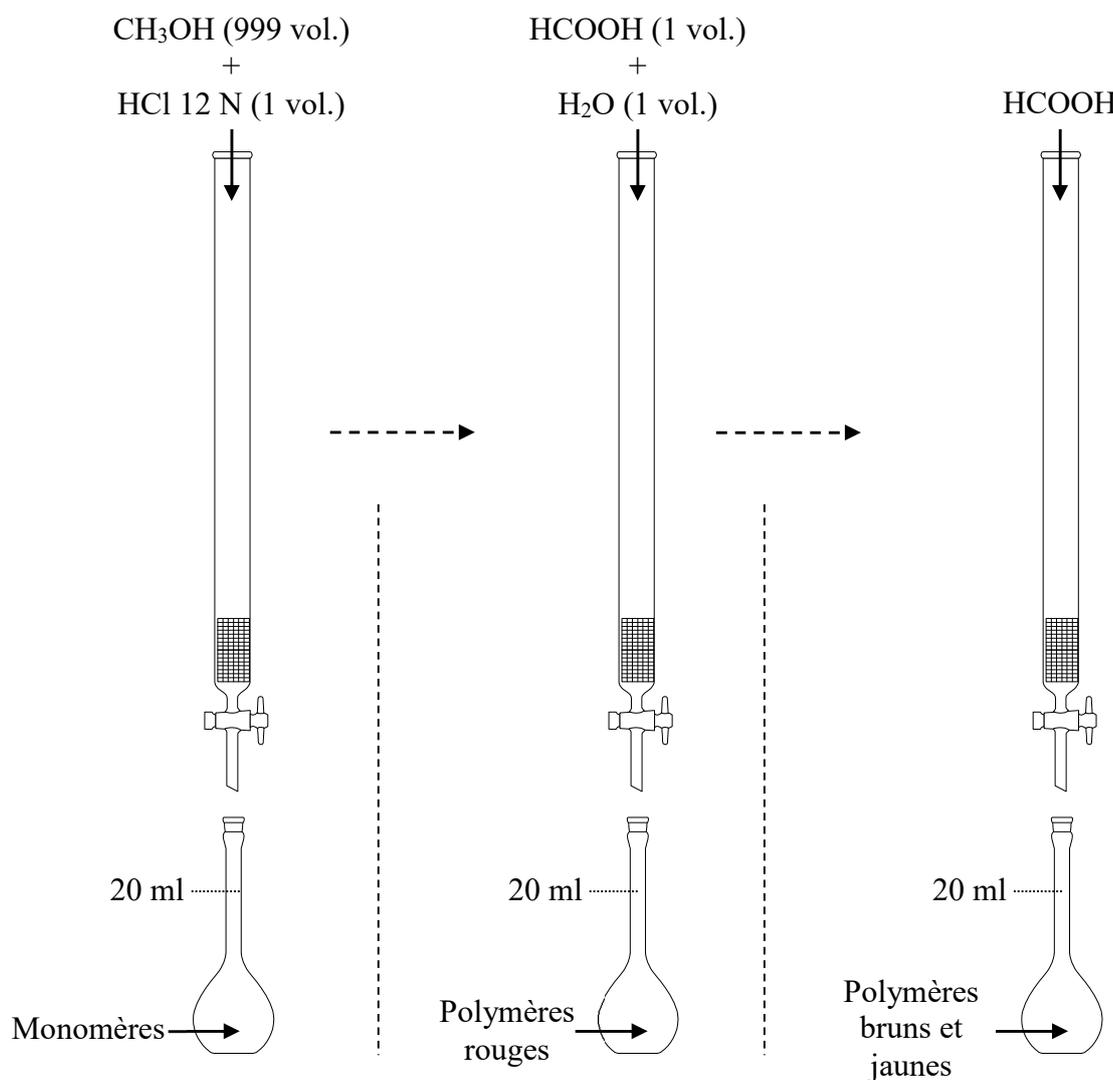
On prépare ensuite la colonne. Il s'agit d'une colonne de 10 mm de diamètre intérieur, de 150 mm de longueur munie d'un robinet et d'un tampon de coton de verre Elle est garnie à l'aide de la préparation ci-dessus (forme humide). La hauteur du mélange adsorbant est de 45 mm.

#### **MODE OPERATOIRE**

1. Mettre la phase stationnaire en suspension dans un bécher et constituer une phase stationnaire dans la colonne à chromatographie, sur une hauteur de 4,5 à 5 cm
2. Bien laver à l'eau (2 fois le volume de la colonne), sans remettre en suspension la phase stationnaire et sans assécher cette même phase
3. Diluer le vin au ½ avec du méthanol chlorhydrique (999 vol. de méthanol R.P. + 1 vol. d'HCl 12 N). Pour les jus de raisin et les concentrés de jus de raisin fortement colorés, il faut diluer davantage.
4. Introduire un aliquot de 2 ml dans la colonne
5. Laver la colonne à l'eau avec le volume d'une colonne
6. Eluer les monomères à l'aide du mélange méthanol R.P. (999 vol.) et HCl 12 N (1 vol.). Recueillir ces monomères dans 20 ml d'éluat ( $E_1$ ).
7. Eluer les polymères rouges à l'aide d'un mélange d'acide formique et d'eau (1/1 en vol.). Recueillir ces polymères dans 20 ml d'éluat ( $E_2$ ).
8. Eluer les polymères bruns et jaunes par l'acide formique pur R.P. Recueillir ces polymères

dans 20 ml d'éluat ( $E_3$ ).

9. En utilisant l'eau distillée comme blanc, lire l'absorbance des éluats sous 1 cm d'épaisseur à :
- 538 nm pour le premier éluat
  - 525 nm pour le deuxième et le troisième éluat.



Le taux de monomères est donné par l'équation :

$$T_1 = \frac{E_1}{E_1 + E_2 + E_3} \times 100$$

Le taux de polymères rouges est donné par l'équation

$$T_2 = \frac{E_2}{E_1 + E_2 + E_3} \times 100$$

Le taux de polymères brune et jaunes est donné par l'équation

$$T_3 = \frac{E_3}{E_1 + E_2 + E_3} \times 100$$

Où  $E_1$ ,  $E_2$  et  $E_3$  sont les absorbances pour les éluats 1, 2 et 3, respectivement.

### **5.1.10 Indice d'ionisation des anthocyanes**

#### **PRINCIPE**

L'indice d'ionisation (Glories, 1978) inspiré des travaux de Somers et Evan (1974), permet de définir le pourcentage d'anthocyanes libres et combinées se trouvant sous forme colorée dans le vin. Pour le calculer, on décolore le vin par un excès de  $\text{SO}_2$ , d'une part au pH du vin ( $\Delta A_\alpha$ ) et d'autre part à pH 1 ( $\Delta A_\gamma$ ) ; l'indice d'ionisation est donné par le rapport de ces deux valeurs.

#### **MODE OPERATOIRE**

1. Au pH du vin, on mélange 10 mL de vin et 2 mL d'eau : on obtient une valeur d'absorbance ( $A_1$ ) à 520 nm sous 1 mm de parcours optique
2. Au pH du vin, on mélange 10 mL de vin et 2 mL d'hydrogénosulfite de sodium ( $d = 1,24$ ) ; on attend 5 minutes et on obtient, dans les mêmes conditions, une valeur  $A_2$

$$\Delta A_\alpha = (A_1 - A_2) \times \frac{12}{10}$$

Cette valeur représente d'absorbance à 520 nm, exclusivement des anthocyanes colorées au pH du vin, libres  $A_l$  et combinées  $TA$ , réagissant avec le  $\text{SO}_2$ .

Une mesure identique est effectuée à pH 1,2 auquel 95 % des anthocyanes présentes sont colorées.

3. On mélange 1 mL de vin, 7 mL d'HCl (N/10) et 2 mL d'eau. L'absorbance à 520 nm, sous 1 cm de parcours optique, donne une valeur  $A'_1$
4. On mélange 1 mL de vin, 7 mL d'HCl (N/10) et 2 mL d'hydrogénosulfite de sodium ( $d = 1,24$ ) ; on attend 5 minutes et on obtient, dans les mêmes conditions, une valeur  $A'_2$

$$\Delta A_\gamma = (A'_1 - A'_2) \times \frac{100}{95}$$

L'indice d'ionisation est donné par l'expression :

$$I_{\text{ionisation}} = \frac{\Delta A_{\alpha}}{\Delta A_{\gamma}} \times 100$$

La valeur de l'indice d'ionisation, pour les vins jeunes, est de 10 à 30 % ; elle augmente au cours du vieillissement, pour atteindre 80 à 90 % dans les vins vieux.

Si la matière colorante du vin rouge était constituée uniquement d'anthocyanes à l'état libre,  $A_l$ , compte tenu du pH (3,4 à 4) et de la teneur en « SO<sub>2</sub> libre » (10 à 30 mg/L), les pourcentages de coloration seraient plus faibles (3 % à 14 %). A mesure que les anthocyanes se combinent avec les tanins, ce pourcentage augmente, car les nouveaux pigments sont bien moins sensibles à la décoloration par le pH et le SO<sub>2</sub>. Un tel phénomène se produit au cours du vieillissement du vin.

## 5.2 Eléments minéraux

### 5.2.1 Dosage du potassium, sodium, fer & cuivre par absorption atomique (méthode type I)

#### DOSAGE DU POTASSIUM

##### PRINCIPE

Le potassium est dosé directement dans le vin dilué par spectrophotométrie d'absorption atomique après addition d'un tampon spectral de chlorure de césium pour éviter l'ionisation du potassium.

##### REACTIFS

###### *APPAREILLAGE*

- Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.
- Lampe à cathode creuse au potassium

###### *SOLUTIONS*

- Solution de potassium à 1 g/L.  
Utiliser une solution standard de potassium du commerce à 1 g/L. Cette solution peut être préparée en dissolvant 4,813 d'hydrogénéotartrate de potassium dans de l'eau distillée et en ajustant le volume à 1 litre.
- Solution modèle
  - Acide citrique (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O) 3,5 g
  - Saccharose 1,5 g

Glycérol	5,0 g
Chlorure de calcium anhydre (CaCl <sub>2</sub> )	50 mg
Chlorure de magnésium anhydre (MgCl <sub>2</sub> )	50 mg
Alcool absolu	50 ml
Eau q.s.p.	500 ml

- Solution de chlorure de césium à 5 %  
Dissoudre 6,330 g de chlorure de césium (CsCl) dans 100 ml d'eau distillée.

## MODE OPERATOIRE

### PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- Prélever 2,5 ml de vin (préalablement dilué au 1/10<sup>ème</sup>) et les placer dans une fiole jaugée de 50 ml
- Ajouter 1 ml de la solution de chlorure de césium à 5%
- Amener au trait de jauge avec de l'eau distillée

### ETALONNAGE

- Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, introduire 5 ml de solution modèle
- Placer 0 – 2,0 – 4,0 – 6,0 – 8,0 ml de la solution de potassium à 1 g/L préalablement diluée au 1/10<sup>ème</sup>
- Ajouter dans toutes les fioles 2 ml de la solution de chlorure de césium à 5%
- Ajuster le volume des fioles à 100 ml avec de l'eau distillée

Les solutions-étalons préparées titrent respectivement 0 – 2 – 4 – 6 – 8 mg de potassium par litre et contiennent 1 g de césium par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

## DOSAGE

La mesure avec le spectrophotomètre d'absorption atomique se fait avec une lampe à cathode creuse au potassium à la longueur d'onde de 769,9 nm.

## CALCUL

- Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en potassium des solutions-étalons
- Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration  $C$  en potassium en mg/L
- La concentration en potassium exprimée en mg/L de vin sera :

$$F \times C$$

(avec  $F$ , le facteur de dilution)

## DOSAGE DU SODIUM

Le sodium est dosé directement dans le vin par spectrophotométrie d'absorption atomique après addition d'un tampon spectral de chlorure de césium pour éviter l'ionisation du sodium.

## REACTIFS

### APPAREILLAGE

- Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.
- Lampe à cathode creuse au sodium

### SOLUTIONS

- Solution de sodium à 1 g/L.

Utiliser une solution standard de sodium du commerce à 1 g/L. Cette solution peut être préparée en dissolvant 2,542 g de chlorure de sodium NaCl, desséché, dans de l'eau distillée et en ajustant le volume à 1 litre.

Conserver cette solution dans un flacon en polyéthylène.

- Solution modèle

Acide citrique ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )	3,5 g
Saccharose	1,5 g
Glycérol	5,0 g
Chlorure de calcium anhydre ( $CaCl_2$ )	50 mg
Chlorure de magnésium anhydre ( $MgCl_2$ )	50 mg
Alcool absolu	50 ml
Eau q.s.p.	500 ml

- Solution de chlorure de césium à 5 %

Dissoudre 6,330 g de chlorure de césium ( $CsCl$ ) dans 100 ml d'eau distillée.

## MODE OPERATOIRE

### PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- Prélever 2,5 ml de vin et les placer dans une fiole jaugée de 50 ml
- Ajouter 1 ml de la solution de chlorure de césium à 5%
- Amener au trait de jauge avec de l'eau distillée

### ETALONNAGE

- Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, introduire 5 ml de solution modèle
- Placer 0 – 2,5 – 5,0 – 7,5 – 10,0 ml de la solution de sodium à 1 g/L préalablement diluée au 1/100<sup>ème</sup>
- Ajouter dans toutes les fioles 2 ml de la solution de chlorure de césium à 5%
- Ajuster le volume des fioles à 100 ml avec de l'eau distillée

Les solutions-étalons préparées titrent respectivement 0 – 0,25 – 0,50 – 0,75 – 1,00 mg de sodium par litre et contiennent 1 g de césium par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

### DOSAGE

La mesure avec le spectrophotomètre d'absorption atomique se fait avec une lampe à cathode creuse au sodium à la longueur d'onde de 589 nm.

### *CALCUL*

- Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en sodium des solutions-étalons
- Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration  $C$  en sodium en mg/L
- La concentration en sodium exprimée en mg/L de vin sera :

$$F \times C$$

(avec  $F$ , le facteur de dilution)

## **DOSAGE DU FER**

Après élimination de l'alcool, le fer est dosé directement par spectrophotométrie d'absorption atomique.

## **REACTIFS**

### *APPAREILLAGE*

- Evaporateur rotatif.
- Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.
- Lampe à cathode creuse en fer.

### *SOLUTIONS*

- Solution étalon concentrée de fer III titrant 1 g/L.  
Utiliser une solution standard de fer du commerce à 1 g/L. Cette solution peut être préparée en dissolvant 8,6341 g de sulfate de fer et d'ammonium  $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ , dans de l'eau distillée légèrement acidifiée par de l'acide chlorhydrique 1 M et en ajustant le volume à 1 litre.
- Solution étalon de fer titrant 100 mg/L.

## **MODE OPERATOIRE**

### *PREPARATION DE L'ECHANTILLON*

- Eliminer l'alcool du vin (50 ml) par concentration du volume de l'échantillon au demi à l'aide d'un évaporateur rotatif (50 – 60 °C).
- Ramener au volume initial avec de l'eau distillée.
- Effectuer si nécessaire une dilution préalablement au dosage.

### *ETALONNAGE*

- Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 1 – 2 – 3 – 4 – 5 ml de la solution de fer à 100 mg/L
- Ajuster le volume des fioles à 100 ml avec de l'eau distillée.

Les solutions-étalons préparées titrent respectivement 1 – 2 – 3 – 4 – 5 mg de fer par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

### *DOSAGE*

La mesure avec le spectrophotomètre d'absorption atomique se fait avec une lampe à cathode creuse de fer à la longueur d'onde de 248,3 nm.

### *CALCUL*

- Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en fer des solutions-étalons
- Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration  $C$  en fer en mg/L
- La concentration en fer exprimée en mg/L de vin sera :

$$F \times C$$

(avec  $F$ , le facteur de dilution)

## **DOSAGE DU CUIVRE**

### **PRINCIPE**

Le cuivre est dosé directement par spectrophotométrie d'absorption atomique.

### **REACTIFS**

#### *APPAREILLAGE*

- Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.
- Lampe à cathode creuse en cuivre.

#### *SOLUTIONS*

- Solution étalon concentrée de cuivre titrant 1 g/L.  
Utiliser une solution standard de cuivre du commerce à 1 g/L. Cette solution peut être préparée en pesant 1,00 g de cuivre métal, qui est transféré quantitativement dans une fiole jaugée de 1000 ml. Ajouter de l'acide nitrique dilué au ½ en quantité strictement suffisante pour dissoudre le métal, ajouter 10 ml d'acide nitrique concentré et porter au trait de jauge avec de l'eau distillée.
- Solution étalon de cuivre titrant 100 mg/L.  
Prélever 10 ml de la solution de cuivre à 1 g/L et les placer dans une fiole jaugée de 100 ml en complétant au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### **MODE OPERATOIRE**

#### *PREPARATION DE L'ECHANTILLON*

- Prélever 5 ml de l'échantillon de vin et les placer dans une fiole jaugée de 25 ml.
- Ramener au volume initial avec de l'eau distillée.
- Modifier si nécessaire la dilution préalablement au dosage.

#### *ETALONNAGE*

- Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 0,5 – 1 – 2 ml de la solution de cuivre à 100 mg/L
- Ajuster le volume des fioles à 100 ml avec de l'eau distillée.

Les solutions-étalons préparées titrent respectivement 0,5 – 1 – 2 mg de cuivre par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

#### DOSAGE

La mesure avec le spectrophotomètre d'absorption atomique se fait avec une lampe à cathode creuse de cuivre à la longueur d'onde de 324,8 nm.

#### CALCUL

- Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en cuivre des solutions-étalons
- Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration  $C$  en cuivre en mg/L
- La concentration en cuivre exprimée en mg/L de vin sera :

$$F \times C$$

(avec  $F$ , le facteur de dilution)

### 5.2.2 Dosage des chlorures : méthode potentiométrique (méthode type I)

#### PRINCIPE

Les chlorures sont dosés directement dans le vin par potentiométrie en utilisant l'électrode Ag/AgCl. Les ions chlorure  $\text{Cl}^-$  présents dans l'échantillon réagissent avec une solution titrée de nitrate d'argent  $\text{AgNO}_3$  ; l'augmentation du potentiel de la solution après chaque ajout d' $\text{AgNO}_3$  est mesuré par l'électrode. Au point d'équivalence on observe un saut de potentiel important de la solution. Le volume correspondant au point d'équivalence est calculé en utilisant la formule :

$$V = V' + \Delta V \times \left( \frac{\Delta\Delta E_1}{\Delta\Delta E_1 + \Delta\Delta E_2} \right)$$

avec :

$V$ , le volume de solution titrée au point équivalent

$V'$ , le volume de solution titrée avant le plus grand saut de potentiel

$\Delta V$ , le volume constant des fractions de solution titrée ajoutée, soit 0,25 ml

$\Delta\Delta E_1$ , la différence de potentiel seconde avant la plus grande variation du potentiel

$\Delta\Delta E_2$ , la différence de potentiel seconde après la plus grande variation du potentiel

La première étape correspond à l'étalonnage avec une solution de concentration connue en ions chlorure. L'étalonnage est nécessaire car le titre du réactif peut varier ainsi que les paramètres de

l'électrode. Cela permet donc de déterminer le volume d'AgNO<sub>3</sub> équivalent à une quantité/concentration donnée en ion chlorure.

La deuxième étape correspond au dosage : le vin remplace la solution étalon de chlorure et le volume d'AgNO<sub>3</sub> obtenu est rapporté directement à la concentration en ions chlorure dans l'échantillon. Que ce soit pour l'étalonnage ou pour le dosage, on dilue suffisamment pour avoir assez de volume (100 ml) : le résultat ne s'en trouve pas modifié puisque c'est la quantité dans le bêcher qui compte et non pas la concentration.

## APPAREILLAGE

- pH-mètre millivoltmètre gradué au moins de 2 en 2 mV
- Agitateur magnétique
- Electrode Ag/AgCl, avec une solution saturée de nitrate de potassium comme électrolyte
- Microburette graduée au 1/100<sup>ème</sup> de ml
- Chronomètre

## REACTIFS

- Solution étalon de chlorures : 2,1027 g de chlorure de potassium, KCl (max. 0,005 % de Br), desséchés avant l'emploi par conservation durant quelques jours dans un dessiccateur, sont dissous dans de l'eau distillée. Porter au litre : 1 ml de cette solution contient 1 mg de Cl<sup>-</sup>.
- Solution titrée de nitrate d'argent : 4,7912 g de nitrate d'argent, AgNO<sub>3</sub> pour analyses, sont dissous et portés au litre dans une solution alcoolique à 10 % (v/v). 1 ml de cette solution correspond à 1 mg de Cl<sup>-</sup>.
- Acide nitrique pur au moins à 65 % ( $\rho_{20} = 1,40$  g/ml).

## MODE OPERATOIRE

1. Ouvrir l'électrode
2. Mettre en place le bêcher contenant l'étalon (5 ml de la solution chlorure à 1 g/L) avec environ 100 ml d'eau et 1 ml d'acide nitrique
3. Mettre le pH-mètre en position « mV ». A stabilisation, noter la valeur du potentiel
4. Ajouter le AgNO<sub>3</sub> par aliquot de 0,25 ml. Après chaque ajout, attendre 30 s (chronomètre) et noter la valeur du potentiel
5. Après environ 5,25 à 5,5 ml,  $\Delta mV$  commencera à diminuer, pour vérifier que le plus grand saut a été dépassé, aller jusqu'à 6,5 à 7 ml
6. Calculer V<sub>1</sub>, soit le volume d'AgNO<sub>3</sub> équivalent à 5 mg de Cl<sup>-</sup>
7. Répéter l'expérience pour 50 ml vin additionné de 50 ml d'eau et 1 ml d'acide nitrique
8. Calculer V<sub>2</sub>, soit le volume d'AgNO<sub>3</sub> utilisé pour réagir avec le chlorure dans le vin
9. Faire un produit en croix afin de déterminer la quantité (en mg) de Cl<sup>-</sup> dans le vin

*Exemple :*

Volume de solution titrée de AgNO <sub>3</sub> (ml)	Potentiel E (mV)	Différence $\Delta E$	Différence seconde $\Delta\Delta E$
0	204		
0,2	208	4	0
0,4	212	4	2
0,6	218	6	0
0,8	224	6	0
1,0	230	6	2
1,2	238	8	4
1,4	250	12	10
1,6	272	22	22
1,8	316	44	10
2,0	350	34	8
2,2	376	26	6
2,4	396	20	

Dans cet exemple, le point final du titrage se situe entre 1,6 et 1,8 ml car c'est dans cet intervalle qu'apparaît le plus grand saut de potentiel ( $\Delta E = 44$  mV). Le volume de solution titrée de nitrate d'argent consommé pour doser les chlorures dans la prise d'essai :

$$V = 1,6 + 0,2 \times \left( \frac{22}{22 + 10} \right) = 1,74 \text{ mL}$$

### EXPRESSION DES RESULTATS

Vous réaliserez un tableau à 3 entrées (Potentiel  $E$ , Différence  $\Delta E$ , Différence seconde  $\Delta\Delta E$ ) en fonction du volume d'AgNO<sub>3</sub> versé pour l'étalonnage comme pour l'essai, en prenant soin de donner 4 valeurs avant et 4 valeurs après le plus grand saut de potentiel.

La teneur en chlorure du vin étudié devra être donnée dans 3 unités :

- en mg de Cl<sup>-</sup> / l de vin
- en meq. / l de vin
- en mg de NaCl / l de vin

### 5.2.3 Dosage des phosphates : méthode colorimétrique

#### PRINCIPE

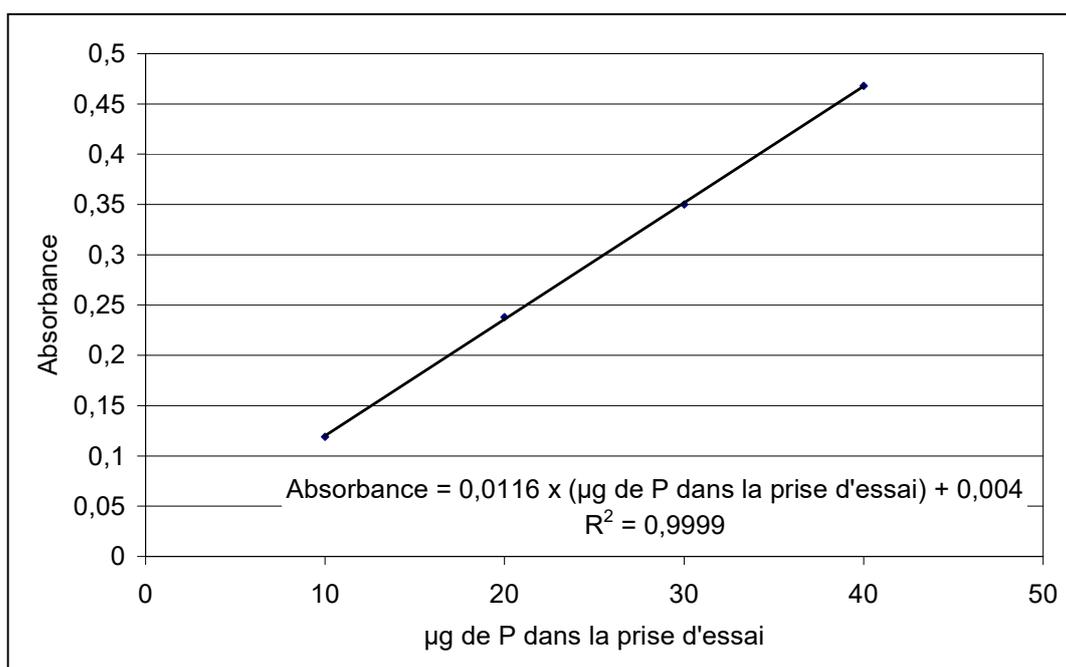
Les phosphates donnent avec le réactif molybdique, un complexe phosphomolybdique. Ce complexe est réductible par divers réducteurs comme l'hydroquinone, l'acide ascorbique et donne une coloration bleu que l'on mesure à 720 nm.

#### MODE OPERATOIRE

1. Diluer le vin (rouge ou blanc au 1/50<sup>ème</sup>)
2. Pour le témoin remplacer le vin par de l'eau distillée
3. Remplir le tube témoin et le tube dosage de la façon suivante :

	Témoin	Dosage
Dilution au 1/50 <sup>ème</sup> du vin (ml)	-	5
Eau distillée(ml)	5	-
Réactif molybdique (ml)	1	1
<i>Agiter modérément les tubes et attendre 1 minute</i>		
Sulfite de sodium à 15 %	1	1
Hydroquinone à 2 %	1	1
HCl au 1/10 <sup>ème</sup>	1	1
Eau distillée	2	2

4. Agiter tous les tubes et laisser au repos au moins 15 minutes.
5. Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 720 nm par rapport au témoin
6. Se rapporter sur la courbe de calibration pour trouver les µg de phosphore dans la prise d'essai.



## EXPRESSION DES RESULTATS

La teneur en phosphore du vin étudié devra être donnée dans 3 unités :

- en mg de phosphore (P) / l de vin
- en mg de phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) / l de vin
- en mg de  $\text{P}_2\text{O}_5$  / l de vin

*Masse atomique phosphore = 31 g/mol*

### **5.2.4 Dosage des sulfates : méthode rapide d'essai**

#### PRINCIPE

Cette méthode est basée sur la précipitation du sulfate par le baryum. On classe les vins en plusieurs catégories par une méthode dite des limites, basée sur la précipitation du sulfate de baryum à l'aide d'une quantité définie de solution titrée de chlorure de baryum.

#### REACTIFS

- Acide sulfurique au 1/10<sup>ème</sup>
- Solution de chlorure de baryum : 2,804 g de chlorure de baryum ( $\text{BaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ ) et 10 ml de HCl pur sont dissous dans de l'eau distillée, en quantité suffisante pour avoir 1 litre de solution. 1 ml de cette solution précipite 2 mg de sulfate de potassium.

#### MODE OPERATOIRE

1. Placer 10 ml de vin dans chacun des trois erlens de 100 ml pyrex
2. Ajouter la solution de chlorure de baryum comme indiqué :
  - 3,5 ml dans l'eren 1
  - 5 ml dans l'eren 2
  - 10 ml dans l'eren 3
3. Agiter chaque erlen et porter à ébullition - Laisser au repos 1h30 – Filtrer
4. Diviser chaque filtrat en 2 et ajouter :
  - quelques gouttes de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré dans le premier aliquot
  - quelques gouttes de  $\text{BaCl}_2$  dans le second aliquot
5. On examine la limpidité ou le trouble de chaque tube, et on conclut de la manière indiquée dans le tableau ci-dessous.

	Vin	Chlorure de baryum	Vin filtré +	
			acide sulfurique	+ chlorure de baryum
1 <sup>er</sup> essai	10 ml	3,5 ml	<i>trouble</i>	<i>limpide</i>
			= moins de 0,7 g de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l	
			<i>limpide</i>	<i>trouble</i>
			= plus de 0,7 g de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l	
2 <sup>ème</sup> essai	10 ml	5,0 ml	<i>trouble</i>	<i>limpide</i>
			= moins de 1,0 g de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l	
			<i>limpide</i>	<i>trouble</i>
			= plus de 1,0 g de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l	
3 <sup>ème</sup> essai	10 ml	10,0 ml	<i>trouble</i>	<i>limpide</i>
			= moins de 2,0 g de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l	
			<i>limpide</i>	<i>trouble</i>
			= plus de 2,0 g de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l	

NB :

- Si le tube dans lequel le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a été ajouté est limpide : il y a un excès de sulfate dans le filtrat par rapport au baryum. Dans ce cas, l'excès de sulfate dans le filtrat va réagir avec la goutte de baryum.
- Si le tube dans lequel le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a été ajouté est trouble : il y a un excès de baryum dans le filtrat et ce baryum réagit avec le sulfate. Dans ce cas, le tube dans lequel la goutte de BaCl<sub>2</sub> a été ajouté sera limpide.
- Exemple : le tube dans lequel la goutte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a été ajouté est limpide, pour le cas où 3,5 et 5 ml de BaCl<sub>2</sub> avaient été ajoutés au préalable. Donc le vin contient plus que 1 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l. Par contre dans le cas où 10 ml de BaCl<sub>2</sub> ont été ajoutés, il reste un excès de baryum dans le filtrat qui a réagi avec le sulfate. Donc le vin contient plus que 1 g/L et moins de 2 g/L de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 5.2.5 Dosage des sulfates : méthode de référence

#### PRINCIPE

Précipitation du sulfate de baryum et pesée. Le phosphate de baryum précipité dans les mêmes conditions est éliminé par un lavage du précipité à l'acide chlorhydrique. Dans les cas de moûts et de vins riches en dioxyde de soufre, un désulfitage préalable par ébullition à l'abri de l'air est prescrit.

#### REACTIFS

- Acide chlorhydrique 2 N
- Chlorure de baryum : 200 g de BaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O pour 1000 ml.

## MODE OPERATOIRE

1. Introduire une prise d'essai de 40 ml vin dans un tube à centrifuger
2. Ajouter 2 ml d'HCl 2N
3. Ajouter 2 ml de BaCl<sub>2</sub>
4. Fermer le tube et agiter
5. Laisser au repos pendant 5 minutes
6. Centrifuger pendant 5 minutes à 3000 tr/min et éliminer délicatement le surnageant
7. Ajouter 10 ml d'HCl 2N et remettre le précipité en suspension
8. Centrifuger pendant 5 minutes à 3000 tr/min et éliminer délicatement le surnageant
9. Répéter deux fois le lavage du précipité dans les mêmes conditions avec 15 ml d'eau distillée à chaque fois
10. Tarer une capsule de silice
11. Transvaser quantitativement en rinçant, avec de l'eau distillée, le précipité dans la capsule et la placer dans l'étuve à 105 °C jusqu'à évaporation à sec.
12. Le précipité desséché est calciné au four à 700 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu blanc
13. Refroidir dans un dessiccateur
14. Peser la capsule avec son résidu

Soit **M**, la masse de sulfate de baryum obtenue.

## EXPRESSION DES RESULTATS

La teneur en sulphate du vin étudié devra être donnée dans 2 unités :

- en meq. / l de vin
- en g de sulfate de potassium (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) / l de vin

*NB* : Les vins très sucrés et les moûts doivent être dilués de telle sorte que la teneur en sucres soit inférieure à 100 g/L.

### 5.2.6 Cendres et alcalinité des cendres

#### DEFINITIONS

On appelle cendres l'ensemble des produits de l'incinération du résidu d'évaporation du vin, conduite de façon à obtenir la totalité des cations (ammonium exclu) sous forme de carbonates et autres sels minéraux anhydres.

On appelle alcalinité des cendres la somme des cations, autres que l'ammonium, combinés aux acides organique du vin.

#### PRINCIPE DE LA METHODE

*CENDRES* : incinération de l'extrait du vin conduite entre 500°C et 550°C jusqu'à combustion complète du carbone.

*ALCALINITE DES CENDRES* : titrimétrie en présence de méthyl-orange sur les cendres solubilisées à chaud par un excès connu d'acide titré.

## REACTIFS ET APPAREILLAGE

### *CENDRES :*

- Etuve à 105 °C.
- Balance sensible au 1/10 de milligramme.
- Plaque chauffante ou évaporateur à infra-rouge.
- Four électrique à régulation de température.
- Dessiccateur.
- Capsule de platine de 70 mm de diamètre et de 25 mm de hauteur à fond plat.

### *ALCALINITE DES CENDRES :*

- Solution 0,1 N d'acide sulfurique
- Solution 0,1 d'hydroxyde de sodium
- Solution de méthylorange à 0,1 % dans l'eau distillée

## MODE OPERATOIRE

### *CENDRES :*

1. Laver et faire brûler la capsule en silice sur un bec bunsen (10 minutes)
2. Refroidir dans le dessiccateur et faire la tare de la capsule
3. Mettre 20 ml de vin dans la capsule
4. Evaporer à l'étuve pendant environ 30 minutes afin d'obtenir un extrait (qui ressemble à un miroir)
5. Carboniser au bec bunsen pendant 5 à 10 minutes afin d'obtenir un résidu noir de carbone. Pendant cette étape, il faut faire attention de ne pas laisser l'extrait s'enflammer
6. Chauffer au four à  $525 \pm 25$  °C jusqu'à l'obtention des cendres « blanches ». Si, au bout d'environ 30 minutes les cendres ne sont pas complètement blanches, elles sont reprise dans 2-3 ml d'eau, broyées à l'aide d'une baguette de verre, évaporées de nouveau à l'étuve et ensuite chauffées au four jusqu'à l'obtention des cendres blanches (2 heures)
7. Refroidir au dessiccateur (1 heure) et peser la masse de cendres correspondant à la prise d'essai (20 ml).

La quantité de cendres devra être exprimée en g/L de vin

*NB :* Pour les vins riches en sucres, il est commode d'ajouter à l'extrait quelques gouttes d'huile végétale pure avant la première incinération, pour empêcher le débordement du contenu.

### *ALCALINITE DES CENDRES :*

1. Dans la capsule de silice contenant les cendres de 20 ml de vin, ajouter 10 ml d'acide sulfurique 0,1 N ( $H_2SO_4$  est ajouté en excès)
2. Placer la capsule dans l'étuve pendant 15 min environ, en écrasant le résidu avec une baguette de verre pour activer la dissolution

3. Ajouter ensuite 2 gouttes de solution de méthyl-orange et titrer l'excès d'acide sulfurique par la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N jusqu'à virage au jaune de l'indicateur

## EXPRESSION DES RESULTATS

L'alcalinité devra être exprimée :

en meq. / l de vin

en g de  $K_2CO_3$  / l de vin.

*NB* : La masse d'un équivalent de  $K_2CO_3$  = la masse moléculaire de  $K_2CO_3$  / 2  
=  $138 / 2 = 69$  g/eq.

### 5.2.7 Acidité totale

#### DEFINITION

L'acidité total du vin est la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH d'un vin à 7 par addition d'une liqueur alcaline titrée. Le dioxyde de carbone n'est pas compris dans l'acidité totale.

#### PRINCIPE

L'acidité totale est dosée par titrage en utilisant une solution de NaOH 0,1 N en présence de bleu de bromothymol (BBT) comme indicateur de fin de réaction par comparaison à un étalon de coloration.

#### MODE OPERATOIRE

##### *DECARBONICATION*

1. Placer environ 50 ml vin dans une fiole à vide
2. Boucher la fiole
3. Adapter la trompe à vide à la fiole et ouvrir le robinet de vide
4. Agiter la fiole environ 2 / 3 minutes

##### *DOSAGE*

Dans un bêcher de 300 ml placer :

1. 30 ml d'eau distillée décarboniquée
2. 1 ml de BBT
3. 10 ml de vin décarboniqué
4. Titrer à la soude NaOH 0,1N (*NB* : virage bleu vert = vert canard)

L'acidité totale devra être exprimée :

- meq. / l de vin,
- en g d' $H_2SO_4$  / l de vin,
- g d'acide tartrique / l de vin.

En lien avec l'alcalinité des cendres de votre vin, calculer le pouvoir tampon ( $\beta$ ) de votre vin en meq. / l.

<b>INDICE de POLYPHENOLS TOTAUX (IPT)</b>	Absorbance à 280 nm	<input type="text"/>
<b>COULEUR ET CARACTERISTIQUES CHROMATIQUES</b>	Absorbance à 420 nm	<input type="text"/>
	Absorbance à 520 nm	<input type="text"/>
	Absorbance à 620 nm	<input type="text"/>
<b>INDICE DE FOLIN CIOCALTEU</b>	Absorbance à 700 nm	<input type="text"/>
<b>DOSAGE DES TANINS TOTAUX</b>	Absorbance à 520 nm (tube à froid)	<input type="text"/>
	Absorbance à 520 nm (tube chauffé)	<input type="text"/>
	Absorbance à 550 nm (tube à froid)	<input type="text"/>
	Absorbance à 550 nm (tube chauffé)	<input type="text"/>
<b>INDICE HCl</b>	Absorbance à 280 nm (A0)	<input type="text"/>
	Absorbance à 280 nm (A1)	<input type="text"/>
<b>INDICE DE GELATINE = dosage des tanins (méthode LA) à l'issue des 3 jours</b>	Absorbance à 550 nm (tube à froid)	<input type="text"/>
	Absorbance à 550 nm (tube chauffé)	<input type="text"/>
<b>INDICE DE DIALYSE</b>	Absorbance à 280 nm du dialysat (A1)	<input type="text"/>
<b>DOSAGE DES ANTHOCYANES</b>	Absorbance à 520 nm (tube avec l'eau)	<input type="text"/>
	Absorbance à 520 nm (tube avec l'hydrogénosulfite de sodium)	<input type="text"/>
<b>DOSAGE DES ANTHOCYANES LIBRES, FAIBLEMENT POLYMERISES ET CONDENSES</b>	Absorbance à 538 nm (premier éluat)	<input type="text"/>
	Absorbance à 525 nm (deuxième éluat)	<input type="text"/>
	Absorbance à 525 nm (troisième éluat)	<input type="text"/>
<b>INDICE D'IONISATION DES ANTHOCYANES</b>	Au pH du vin = Absorbance à 520 nm (tube avec l'eau)	<input type="text"/>
	Au pH du vin = Absorbance à 520 nm (tube avec l'hydrogénosulfite de sodium)	<input type="text"/>
	A pH acide (1,2) = Absorbance à 520 nm (tube avec l'eau)	<input type="text"/>
	A pH acide (1,2) = Absorbance à 520 nm (tube avec l'hydrogénosulfite de sodium)	<input type="text"/>

<b>DOSAGE DU POTASSIUM : METHODE PAR ABSORPTION ATOMIQUE</b>		
Concentration en potassium dans la fiole jaugée (mg/L)		
<b>DOSAGE DU SODIUM : METHODE PAR ABSORPTION ATOMIQUE</b>		
Concentration en sodium dans la fiole jaugée (mg/L)		
<b>DOSAGE DU FER : METHODE PAR ABSORPTION ATOMIQUE</b>		
Concentration en fer dans la fiole jaugée (mg/L)		
<b>DOSAGE DU CUIVRE : METHODE PAR ABSORPTION ATOMIQUE</b>		
Concentration en cuivre dans la fiole jaugée (mg/L)		
<b>DOSAGE DES CHLORURES : METHODE POTENTIOMETRIQUE</b>		
Remplir le tableau suivant en indiquant 4 valeurs avant 4 valeurs après le saut de potentiel (Témoin et essai)		
	Volume de AgNO <sub>3</sub> (mL)	Potentiel E (mV)
Valeurs 1 (Témoin)		
Valeurs 2 (Témoin)		
Valeurs 3 (Témoin)		
Valeurs 4 (Témoin)		
Valeurs 5 (Témoin)		
Valeurs 6 (Témoin)		
Valeurs 7 (Témoin)		
Valeurs 8 (Témoin)		
Valeurs 1 (Essai)		
Valeurs 2 (Essai)		
Valeurs 3 (Essai)		
Valeurs 4 (Essai)		
Valeurs 5 (Essai)		
Valeurs 6 (Essai)		
Valeurs 7 (Essai)		
Valeurs 8 (Essai)		
<b>DOSAGE DES PHOSPHATES : METHODE COLORIMETRIQUE</b>		
Absorbance à 720 nm		
<b>DOSAGE DES SULFATES : METHODE DE REFERENCE</b>		
Masse de la capsule à vide en g (tare)		
Masse de la capsule avec son résidu en g		

<b>CENDRES ET ALCALINITE DES CENDRES</b>	Masse de la capsule à vide en g (tare)	<input type="text"/>
	Masse de la capsule avec son résidu en g	<input type="text"/>
	Volume de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N (mL)	<input type="text"/>
<b>ACIDITE TOTALE</b>	Volume de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N (mL)	<input type="text"/>

## SECTION 6 PEDOLOGIE

---

---

### 6.1 Préliminaires : Prélèvement et préparation des échantillons

#### 6.1.1. Prise d'échantillons

Le prélèvement d'échantillons de sol s'effectue de différentes manières selon le but que l'on se propose :

- S'il s'agit uniquement d'analyser un sol de culture en vue de déterminer la fertilité de la couche arable, on fera en général deux prélèvements :
  - Un de sol : 0-30 cm de profondeur **qui nous servira pour les analyses en TP**
  - Un de sous-sol : 30-60 cm de profondeurOn parle alors de prélèvement agrologique.
- S'il s'agit d'étudier le sol en soi, en vue de connaître la dynamique de ses éléments dans les différentes couches, on fera un prélèvement pédologique.

#### PRELEVEMENT AGROLOGIQUE

a) Bien nettoyer la surface du sol. Faire un trou rectangulaire de 30 cm sur 40 cm et de 30 cm de profondeur. Prélever avec un fer de bêche un tranche d'environ 10 cm d'épaisseur sur le petit côté du rectangle et sur toute la hauteur. Introduire l'échantillon dans un sac propre.

b) Poursuivre le creusement du trou jusqu'à la profondeur désirée (60 cm) de manière à laisser une marche d'escalier qui servira à prélever l'échantillon de sous-sol.

c) Dans tous les cas, on observera la nature du terrain, les formations géologiques sous-jacentes, la présence de nappes d'eau à des profondeurs variables, la nature et le comportement de la végétation.

#### PRELEVEMENT PEDOLOGIQUE

a) On creuse une tranchée profonde jusqu'à la roche-mère. On nettoie bien une des surfaces sur la tranchée et on obtient ainsi une coupe de sol.

b) Cette coupe est étudiée avec soin de manière à déterminer les divers horizons et des prélèvements sont effectués dans chacun de ses horizons.

#### 6.1.2 Préparation des échantillons pour l'analyse

- Etaler l'échantillon sur un papier fort, écraser les mottes manuellement et réduire en miettes aussi fines que possible et laisser sécher à l'air (si l'émiettement n'est pas assez fin, l'échantillon sera écrasé avec un rouleau de fonte)

- Tamiser sur tamis à mailles de 2 mm :

La partie qui reste sur le tamis constitue les cailloux et les graviers alors que celle qui passe à travers le tamis constitue la terre fine. Les analyses sont effectuées uniquement sur la terre fine séchée à l'air

- Introduire la terre fine dans un sachet ou un flacon

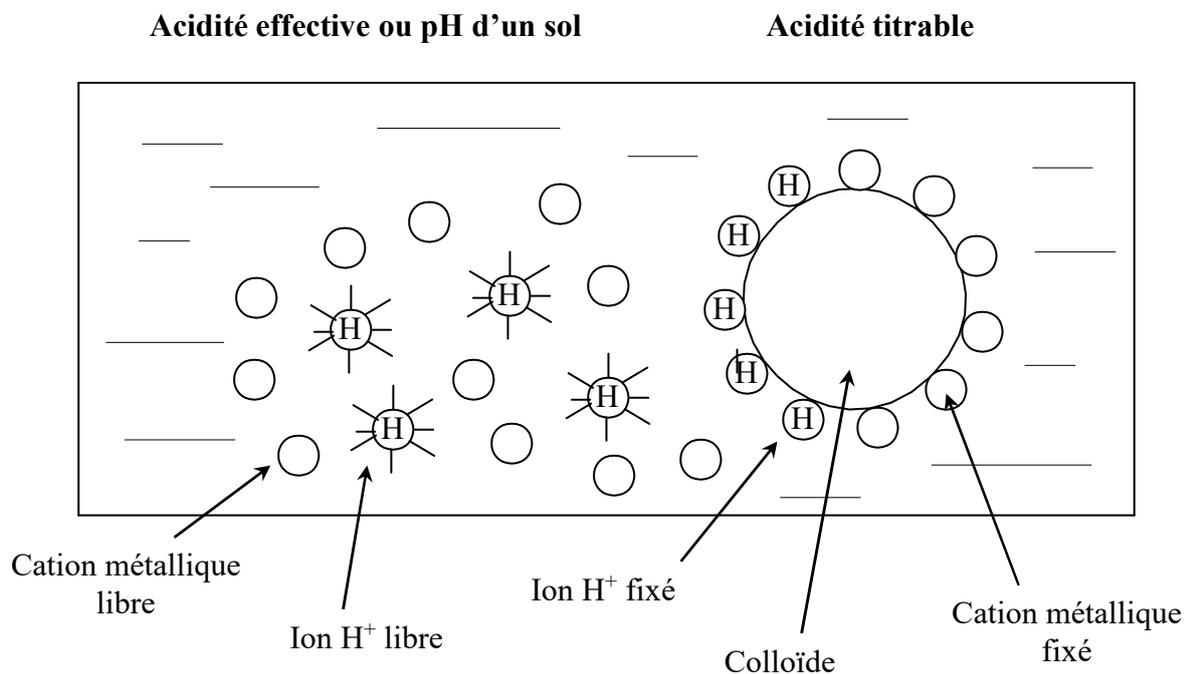
## 6.2 PH d'un sol

### 6.2.1 Définition

L'acidité du sol est définie par la concentration en ions  $H^+$  : on oppose l'acidité effective qui correspond à la concentration en  $H^+$  libres, existant dans la solution du sol, à l'acidité titrable qui est représentée par les ions  $H^+$  échangeables (beaucoup plus abondants) fixés par les colloïdes et qui constitue une réserve actuellement non disponible. Les sols ont une réaction neutre, acide ou basique. Leur degré d'acidité ou de basicité (alcalinité) est exprimé par le pH. La mesure du pH constitue ainsi le test le plus sensible des modifications survenant dans l'évolution d'un sol.

Le pH du sol dépend également du complexe argilo-humique.

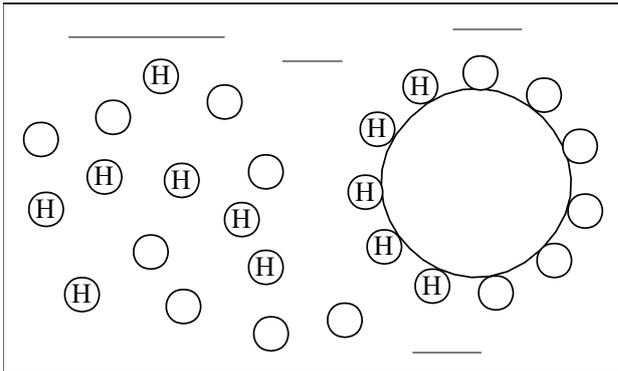
Des ions  $H^+$  sont fixés sur le complexe. Ces ions  $H^+$  fixés sont en équilibre avec les ions libres de la solution du sol.



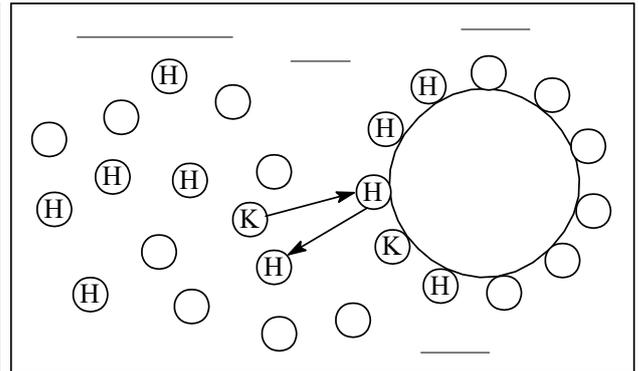
L'acidité effective, ou acidité active ou acidité réelle est mesurée avec le pH mètre après un contact terre/eau déterminé. C'est le pH eau.

L'acidité titrable, ou acidité de réserve, est mesurée soit par titration, soit par échange avec une solution saline, par exemple une solution de KCl. On échange ainsi une partie des  $H^+$  adsorbés par du potassium. C'est le pH KCl.

### Le pH eau (terre + eau distillée)



### Le pH KCl (terre + solution de KCl)



Le pH KCl est normalement plus acide que le pH eau (excepté dans certains sols sodiques ou le pH-eau = pH-KCl): les ions  $K^+$ , en prenant la place d'ions  $H^+$  sur le complexe, font apparaître une acidité d'échange d'autant plus forte que l'acidité titrable est élevée.

- 1 unité d'écart entre le pH-eau et le pH-KCl → acidité titrable forte
- 0,5 unité d'écart entre le pH-eau et le pH-KCl → acidité titrable moyenne
- < 0,5 unité d'écart entre le pH-eau et le pH-KCl → acidité titrable faible

### 6.2.2 Principe

Le pH se mesure avec un pH mètre.

On constitue une suspension de sol dans l'eau (pH-eau) puis dans l'eau + KCl (pH-KCl) dans laquelle on mesure le pH, c'est à dire la concentration en ions  $H^+$  à l'état dissocié, dans le liquide surnageant.

Lors de l'expression des résultats, il est toujours indispensable de préciser la méthode de mesure et le rapport pondéré terre fine / eau.

Dans la suite de la description de la méthode, nous utiliserons le rapport terre-eau 2:5 (m:v) pour des raisons de commodités pratiquées depuis toujours dans la quasi-totalité des laboratoires d'analyse des sols.

### 6.2.3 Mode opératoire

#### • Mesure du pH-eau :

- Peser 20 g de sol dans un flacon de 60 mL
- Ajouter 50 mL de solution d'eau distillée
- Agiter 30 minutes
- Laisser reposer
- Plonger l'électrode dans le liquide surnageant et effectuer la mesure

NB : Laisser la lecture se stabiliser durant plusieurs secondes

### • Mesure du pH-KCl :

- Peser 20 g de sol dans un flacon de 60 mL
- Ajouter 50 mL de solution de chlorure de potassium  $1 \text{ mol.l}^{-1}$
- Agiter 30 minutes
- Laisser reposer
- Plonger l'électrode dans le liquide surnageant et effectuer la mesure.

NB : Laisser la lecture se stabiliser durant plusieurs secondes

### Remarque :

**Dans le cas d'un sol dont le pH-eau < 6, il est alors nécessaire de déterminer le besoin en chaux du sol** afin de calculer la quantité de chaux nécessaire pour remonter le pH à une valeur souhaitée. Pour cela, on mesure le pH de suspensions de sol après trois ajouts de quantités croissantes d'eau de chaux.

## 6.3 Conductivité

### 6.3.1 Principe

La mesure de la conductivité électrique de la solution du sol, effectuée sur un extrait aqueux (rapport (m:v) sol-eau 1:5) permet d'en connaître la concentration en sels solubles par l'intermédiaire de la contribution de toutes les espèces ioniques présentes. En effet, la conductance (qui est l'inverse de la résistance électrique exprimée en ohms) d'une solution s'accroît au fur et à mesure que les concentrations en cations et en anions, porteurs de charges électriques, augmentent.

### 6.3.2 Mode opératoire

- Peser 20 g de sol
- Les introduire dans un flacon de 125 mL
- Ajouter 100 mL d'eau distillée
- Agiter 30 minutes
- Laisser reposer
- Mesurer la conductivité électrique

### 6.3.3 Résultats

- Exprimer la conductivité de la solution en milli Siemens.cm<sup>-1</sup> (mS.cm<sup>-1</sup>)
- La comparer avec la conductivité de l'eau du robinet

## 6.4 Recherche du calcaire

### 6.4.1 Mise en évidence des traces de calcaire

En pratique, il est commode de faire un test rapide pour estimer la richesse du sol en calcaire ; une petite quantité de terre est mise dans un verre de montre et on ajoute un peu d'acide chlorhydrique au  $\frac{1}{2}$ .

- une faible effervescence exclut le recours au calcimètre de Bernard pour le dosage du calcaire total
- une nette effervescence implique le dosage du calcaire total au calcimètre.

On trouvera dans le tableau suivant, le poids P de terre qu'il faut utiliser pour le dosage du calcaire total au calcimètre d'après l'effervescence produite :

Degré d'effervescence	Poids de terre séchée à l'air (g)	Gamme de la teneur en CaCO <sub>3</sub> (%)
Modéré	5,0	0,8 à 3,4
Assez vif	2,0	2,1 à 8,5
Vif	1,0	4,2 à 17
Très vif	0,5	8,5 à 34
Extrêmement vif	0,2	21 à 85

Le tableau donne également les gammes de pourcentage de carbonate de calcium qui correspondent à chaque degré d'effervescence.

### MODE OPERATOIRE

- Introduire dans un tube à essai environ  $\frac{1}{4}$  de terre fine et  $\frac{1}{4}$  d'eau distillée
- Faire bouillir pour chasser l'air emprisonné dans la terre et laisser reposer
- Incliner le tube à 45° et ajouter lentement 1 mL de HCl au  $\frac{1}{2}$
- Observer les fines bulles de CO<sub>2</sub> remontant le long de la génératrice supérieure dans le cas de la présence de calcaire
- Faire tourner le tube incliné pour que tout le sol entre en contact avec l'acide chlorhydrique
- Observer en outre la floculation des argiles.

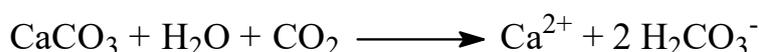
### 6.4.2 Dosage du calcaire total

#### DEFINITION

Le calcaire peut se trouver dans le sol à l'état de fragments de dimensions quelconques depuis les blocs et les graviers jusqu'à la taille des colloïdes argileux. Généralement, les fragments sont des parties de la roche mère qui ont subsisté pour des raisons diverses et notamment grâce à une plus grande résistance aux agents d'altération. A côté de ces débris résiduels de roche mère, on peut trouver dans le même sol, des formes provenant d'une précipitation du calcaire précédemment maintenu à l'état dissous par des solutions du sol. Il arrive aussi que le calcaire

du sol ait une origine biologique et qu'il soit constitué, partiellement ou en totalité, par des coquilles de gastéropodes (hélicidés). Il peut se produire également que le calcaire n'existe pas initialement dans les horizons du sol (roche mère non calcaire) mais qu'il ait été apporté dans le profil en surface par le colluvionnement à l'état fragmentaire, par ruissellement hypodermique à l'état dissous, en profondeur par précipitation du bicarbonate de calcium dissous dans la nappe phréatique, quand celle-ci remonte en saison humide dans les horizons proches de la surface et enfin par apport éolien.

Dans le sol, le calcaire est la source la plus fréquente de calcium, celui-ci étant fixé sous forme d'ions sur le complexe adsorbant. Ce calcium fixé constitue le calcium échangeable du sol ; il est donc fourni au complexe par les solutions du sol dans lesquelles il se trouve à l'état de bicarbonate (provenant du calcaire) mais aussi de sulfate et parfois de nitrate. La dissolution du calcaire à l'état de bicarbonate de calcium dans l'eau chargée de gaz carbonique se fait selon la réaction suivante :



Le calcaire remplit dans le sol plusieurs fonctions et il est d'autant plus actif et efficace (voire toxique) qu'il se trouve à un degré de finesse plus avancé. A l'état de graviers et de sable grossiers, il agit surtout comme élément granulométrique, mais aussi comme réserve de calcium en général assez facilement mobilisable. Mais au sein du calcaire total c'est surtout à l'état de très fines particules susceptibles de se solubiliser rapidement sous forme de bicarbonate qu'il intervient dans les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols : c'est le calcaire actif.

Comme le calcium provoque la floculation des colloïdes argileux et humiques, le calcaire du sol est un élément favorisant la stabilité de la structure et la perméabilité, on sait que l'humus calcique est le meilleur ciment des agrégats.

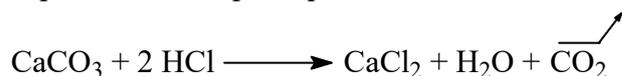
Le calcaire fournit d'autre part aux végétaux le calcium nécessaire à l'édification de leurs tissus. Mais quand le calcaire se trouve dans le sol à la fois en quantité trop forte (notion de calcaire total) et surtout un degré de finesse très avancée (notion de calcaire actif), il peut exercer des influences défavorables. Entre autres, le calcaire fin bloque certains éléments indispensables aux plantes comme le fer et divers oligo-éléments (notamment manganèse, zinc, cuivre), il provoque alors des carences qui se manifestent par des symptômes foliaires et des accidents divers dans le développement des végétaux, par exemple des chloroses. À cet effet, on effectue le dosage du calcaire fin dit « calcaire actif », par la méthode Drouineau, considéré comme la fraction fine capable de précipiter en oxalate de calcium lors de l'adjonction au sol d'oxalate d'ammonium.

Bien que constituant un progrès certain par rapport à la seule détermination du calcaire total, la connaissance du calcaire actif ne permet pas encore de caractériser complètement le pouvoir chlorosant d'un sol. Or, dès la fin du XIXe siècle, il avait été observé que les apports de composés minéraux organiques du fer pouvaient atténuer, voire faire totalement disparaître le pouvoir chlorosant, sans pour autant avoir une influence sur la teneur en calcaire actif. Ce sont ces observations qui ont conduit Juste et Pouget à déterminer dans le sol, outre le calcaire actif, la fraction du fer dénommée conventionnellement « fer facilement extractible », de manière à définir un nouvel indice de pouvoir chlorosant (IPC).

Le dosage du calcaire total est basé sur la réaction acide-base avec l'acide chlorhydrique ; on dose le volume de gaz carbonique dégagé, c'est la méthode du calcimètre de Bernard. Le dosage du calcaire actif est une titration de l'excès d'oxalate d'ammonium n'ayant pas réagi avec le carbonate de calcium « actif », c'est la méthode Drouineau. Le « fer facilement extrait cible » peut être dosé dans l'extrait d'oxalate d'ammonium par colorimétrie après réduction et complexation par l'orthophénantroline.

## PRINCIPE

On décompose par un acide fort (acide chlorhydrique) le carbonate de calcium contenu dans l'échantillon de terre et on mesure le volume de gaz carbonique dégagé par la réaction à la température et à la pression atmosphérique :



Le volume de gaz carbonique dégagé lors de la réaction est mesuré à l'aide d'une burette à gaz (le calcimètre de Bernard). Un poids connu de carbonate de calcium pur pour analyses est traité de la même manière. En comparant les deux volumes, on détermine le taux de carbonates exprimé en carbonate de calcium dans l'échantillon de sol.

- 1 molécule gramme de carbonate de calcium (100 g) donne 22,4 L de gaz carbonique à la pression de 1 atm et à 0 °C.
- 1 litre de gaz carbonique obtenu dans les mêmes conditions est engendré par

$$\frac{100}{22,4} = 4,5 \text{ g de CaCO}_3.$$

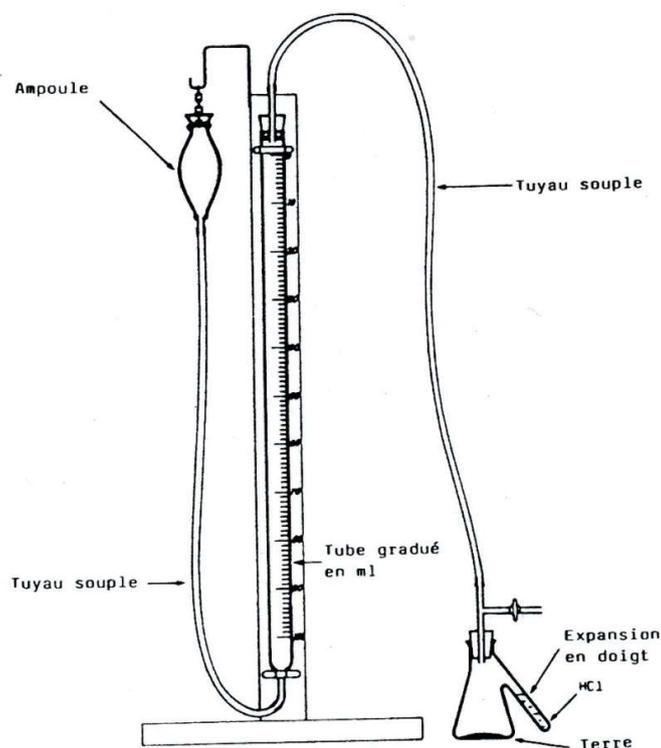
$$\begin{aligned} 0,450 \text{ g de CaCO}_3 &\rightarrow 100 \text{ mL de CO}_2 \\ 0,150 \text{ g de CaCO}_3 &\rightarrow 33,3 \text{ mL de CO}_2 \end{aligned}$$

## MODE OPERATOIRE

### ETALONNAGE DU CALCIMETRE

- Peser 200 mg de carbonate de calcium à 0,1 mg près et verser dans la fiole à réaction. Il est important de tenir la fiole par le col ou le bouchon pour éviter de la chauffer avec la main. De même, il ne faut pas opérer près d'un appareil de chauffage, ou au soleil.
- Rassembler au fond à l'aide de 5 mL d'eau déminéralisée
- Introduire l'acide chlorhydrique au 1/2 dans le tube à hémolyse (rempli au 3/4) et l'introduire dans la fiole à réaction
- Vérifier que le niveau de liquide dans le tube gradué du calcimètre est au zéro
- Adapter la fiole au calcimètre
- Egaliser les pressions d'air de part et d'autre de la colonne liquide du calcimètre

- Prendre la fiole à réaction par son bouchon et renverser l'acide contenu dans le tube à hémolyse sur le carbonate de calcium
- Agiter
- A l'aide du niveau, égaliser en continu et au fur et à mesure du dégagement gazeux, les niveaux de liquide dans l'ampoule et dans le tube de mesure. On équilibre ainsi les pressions d'air de part et d'autre de la colonne liquide du calcimètre.
- Attendre que la réaction soit complète : 1 minute suffit pour le sel pur
- Lire le volume dégagé  $V_1$  : il doit être de l'ordre de 46 mL : en pratique il peut varier de 40 à 50 mL en fonction des conditions atmosphériques.



#### REMARQUE

On peut recommencer l'opération avec une prise d'essai de 100 mg de carbonate de calcium

- Lire le volume dégagé  $V_2$
- Vérifier que  $V_1 = 2 \times V_2$ .

Cet étalonnage ne s'opère qu'une fois par période, les calculs se font alors avec une correction relative à la température.

#### DOSAGE

- Peser à 0,01 g près un poids P (0,25 à 10 g) de terre fine

- L'introduire dans la fiole à réaction. Le poids P doit être choisi de façon à ce que le dégagement de gaz carbonique, d'une part ne soit pas supérieur au volume du tube gradué, d'autre part soit suffisamment grand pour que la lecture de son volume se fasse avec une bonne précision (de 10 à 40 mL, par exemple). Il est important de tenir la fiole par le col ou le bouchon pour éviter de la chauffer avec la main.
- Humidifier l'échantillon de terre dans la fiole avec le moins d'eau possible, pour chasser l'air inclus dans la terre
- Verser l'acide chlorhydrique dans le tube à hémolyse (rempli au 3/4) et l'introduire dans la fiole à réaction sans le renverser
- Egaliser les pressions d'air de part et d'autre de la colonne liquide du calcimètre
- Prendre la fiole à réaction par son bouchon et renverser l'acide contenu dans le tube à hémolyse sur l'échantillon de terre
- Agiter
- A l'aide du niveau, égaliser en continu et au fur et à mesure du dégagement gazeux, les niveaux de liquide dans l'ampoule et dans le tube de mesure. On équilibre ainsi les pressions d'air de part et d'autre de la colonne liquide du calcimètre
- Attendre que la réaction soit complète
- Lire le volume dégagé  $V_3$
- Noter la température de l'air ambiant

Pour que le résultat soit le plus correct possible, il est nécessaire que  $V_1$  et  $V_3$  soient du même ordre de grandeur.

### **CALCULS**

- Calculer le %  $\text{CaCO}_3$  contenu dans le sol
- Calculer également le %  $\text{CaCO}_3$  à partir du tableau :

Pour éviter les calculs et l'étalonnage avant chaque série, il a été établi un tableau qui donne directement les % de carbonate de calcium de l'échantillon d'après le poids de la prise de terre, la lecture sur le calcimètre et d'après la température. Ce tableau, calculé pour une pression atmosphérique de 76 cm de mercure, donne les résultats approchés (puisqu'il néglige les variations de pression) mais suffisants à conditions d'opérer dans les régions de faible altitude.

**Exemple :**

Prise de terre : 1 g

Volume de CO<sub>2</sub> : V = 33 mL

Température : 20 °C

% CaCO<sub>3</sub> = 13,6

Ce tableau n'a pas été établi pour les dégagements de gaz carbonique supérieurs à 50 mL. Lorsque cela arrive, on opère de la façon suivante : pour une prise de terre de P g donnant un dégagement de gaz V supérieur à 50 mL, on prend comme résultat (carbonate de calcium %) celui qui correspond à une prise de terre P/2 donnant un volume de gaz V/2.

**Exemple :**

Prise de terre : 1 g

Volume de CO<sub>2</sub> : V = 80 mL

Température : 20 °C

% CaCO<sub>3</sub> = 33,2 (correspondant à une prise de terre de 0,5 g et à un volume de gaz carbonique de 40 mL à 20 °C).

Volume de CO <sub>2</sub> dégagé	Prise de terre : 0,25 g			0,5 g			1 g			2 g			5 g		
	15°	20°	25°	15°	20°	25°	15°	20°	25°	15°	20°	25°	15°	20°	25°
	0,5	0,7	0,7	0,7	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05
1	1,6	1,6	1,6	0,8	0,8	0,8	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,07	0,07	0,07
1,5	2,5	2,5	2,5	1,2	1,2	1,2	0,6	0,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,12	0,12	0,12
2	3	3	3	1,6	1,6	1,6	0,8	0,8	0,8	0,4	0,4	0,4	0,15	0,15	0,15
2,5	4	4	4	2	2	2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1
3	5	5	5	2,4	2,4	2,4	1,2	1,2	1,2	0,6	0,6	0,6	0,25	0,25	0,25
3,5	5,5	5,5	5,5	2,8	2,8	2,8	1,4	1,4	1,4	0,7	0,7	0,7	0,3	0,3	0,3
4	6,7	6,5	6,5	3,2	3,2	3,2	1,6	1,6	1,6	0,8	0,8	0,8	0,35	0,35	0,35
4,5	7,6	7,4	7,4	3,7	3,7	3,7	1,8	1,8	1,8	0,9	0,9	0,9	0,4	0,4	0,4
5	8,5	8	8	4,1	4,1	4,1	2	2	2	1	1	1	0,45	0,45	0,45
5,5	9,2	8,9	8,9	4,5	4,5	4,5	2,2	2,2	2,2	1,15	1,15	1,15	0,47	0,45	0,45
6	10,1	9,8	9,6	5	5	5	2,5	2,4	2,4	1,25	1,2	1,2	0,5	0,5	0,5
6,5	11	10,5	10,3	5,4	5,3	5,3	2,7	2,6	2,6	1,3	1,3	1,3	0,55	0,55	0,55
7	11,9	11,5	11,3	5,8	5,7	5,7	2,9	2,8	2,8	1,4	1,3	1,3	0,6	0,57	0,57
7,5	12,7	12,3	12,1	6,2	6,1	6,1	3,1	3	3	1,5	1,4	1,4	0,65	0,6	0,6
8	13,6	13,1	13	6,7	6,6	6,5	3,4	3,3	3,2	1,7	1,65	1,6	0,7	0,65	0,65
8,5	14,4	13,9	13,9	7,1	7	7	3,6	3,5	3,4	1,8	1,7	1,7	0,72	0,7	0,7
9	15,3	14,9	14,8	7,5	7,4	7,3	3,8	3,7	3,6	1,9	1,8	1,8	0,75	0,75	0,75
9,5	16,1	15,6	15,6	8	7,9	7,8	3,9	3,8	3,7	2	1,9	1,9	0,8	0,75	0,75
10	16,9	16,4	16,4	8,3	8,2	8,1	4,2	4,1	4	2,1	2	2	0,85	0,8	0,8
10,5	17,8	17,3	17,3	8,8	8,7	8,6	4,4	4,3	4,2	2,2	2,1	2,1	0,9	0,85	0,85
11	18,7	18,1	18,1	9,2	9,1	9	4,6	4,5	4,4	2,3	2,2	2,2	0,95	0,92	0,9
11,5	19,4	18,7	18,7	9,6	9,5	9,4	4,8	4,6	4,5	2,4	2,3	2,1	1	0,95	0,95
12	20,4	20	20	10	9,9	9,8	5	4,9	4,8	2,5	2,45	2,4	1,05	1	1
12,5	21,3	20,7	20,7	10,5	10,4	10,3	5,3	5,2	5,1	2,6	2,55	2,5	1,1	1,05	1,05
13	22,1	21,4	21,4	10,9	10,7	10,6	5,4	5,3	5,2	2,7	2,65	2,6	1,15	1,1	1,08
13,5	23	22,1	22,1	11,3	11,2	11,1	5,6	5,5	5,4	2,8	2,7	2,7	1,2	1,2	1,2
14	23,8	23	23	11,8	11,4	11,4	5,9	5,8	5,7	2,9	2,8	2,8	1,22	1,22	1,1
14,5	24,6	23,9	23,9	12,2	11,9	11,9	6,1	6	5,9	3	2,9	2,9	1,25	1,25	1,12
15	25,5	24,7	24,5	12,5	12,6	12,3	6,3	6,2	6,1	3,1	3	3	1,3	1,25	1,2
15,5	26,3	25,5	25,2	13	12,7	12,7	6,5	6,4	6,3	3,3	3,2	3,1	1,32	1,3	1,25
16	27,2	26,4	26,1	13,5	13,1	13,1	6,8	6,6	6,5	3,4	3,3	3,2	1,35	1,32	1,3
16,5	28	27,3	26,9	13,9	13,6	13,5	7	6,9	6,8	3,5	3,4	3,3	1,4	1,35	1,32
17	28,9	28	27,7	14,4	14	14	7,2	7	6,9	3,6	3,5	3,4	1,45	1,4	1,35
17,5	29,6	29	28,6	14,8	14,5	14,5	7,3	7,2	7,1	3,7	3,6	3,5	1,5	1,45	1,4
18	30,5	29,8	29,5	15,2	14,8	14,7	7,6	7,4	7,3	3,8	3,7	3,6	1,55	1,5	1,45
18,5	31,3	30,6	30,3	15,6	15,3	15,2	7,8	7,6	7,5	3,9	3,8	3,7	1,6	1,55	1,52
19	32,2	31,5	31	16	15,7	15,6	8	7,8	7,7	4	3,9	3,8	1,65	1,6	1,57
19,5	33	32,3	31,8	16,4	16,1	16	8,2	8	7,8	4,1	4	3,9	1,67	1,62	1,6
20	33,8	33	32,7	16,8	16,5	16,3	8,4	8,2	8,1	4,2	4,1	4	1,7	1,65	1,62
20,5	34,7	33,9	33,4	17,3	16,9	16,8	8,7	8,5	8,3	4,3	4,2	4,1	1,75	1,7	1,65
21	35,5	34,8	34,3	17,7	17,4	17,2	8,9	8,7	8,5	4,4	4,3	4,2	1,8	1,75	1,7
21,5	36,5	35,7	35	18,1	17,9	17,7	9,1	8,9	8,7	4,5	4,4	4,3	1,85	1,8	1,75
22	37,3	36,5	36	18,6	18,3	18	9,3	9,1	8,9	4,6	4,5	4,4	1,9	1,85	1,8
22,5	38	37,2	36,8	19	18,7	18,4	9,5	9,3	9,1	4,7	4,6	4,5	1,95	1,9	1,85
23	38,9	38,1	37,6	19,4	19,1	18,8	9,7	9,5	9,3	4,9	4,7	4,6	2	1,95	1,9
23,5	39,8	39	38,5	19,8	19,5	19,2	10	9,7	9,5	5	4,8	4,7	2,05	2	1,95
24	40,6	39,8	39,2	20,3	20	19,7	10,1	10	9,7	5,1	5	4,9	2,1	2,05	2
24,5	41,5	40,5	40	20,6	20,4	20,1	10,4	10,2	10	5,2	5,1	5	2,15	2,1	2,05
25	42,3	41,4	40,9	21	20,8	20,5	10,6	10,3	10,2	5,3	5,2	5,1	2,2	2,15	2,1
25,5	43,2	42,1	41,6	21,5	21,3	20,9	10,8	10,5	10,3	5,4	5,3	5,2	2,25	2,2	2,05
26	44	43	42,5	21,9	21,6	21,2	11	10,6	10,5	5,5	5,4	5,3	2,3	2,25	2,2
26,5	44,9	44	43,4	22,4	22	21,7	11,2	11	10,8	5,6	5,5	5,4	2,32	2,3	2,25
27	45,7	44,8	44,1	22,8	22,4	22,1	11,4	11,1	10,9	5,7	5,6	5,5	2,35	2,3	2,25
27,5	46,5	45,6	44,9	23,2	22,8	22,5	11,6	11,3	11,1	5,8	5,7	5,6	2,37	2,32	2,3

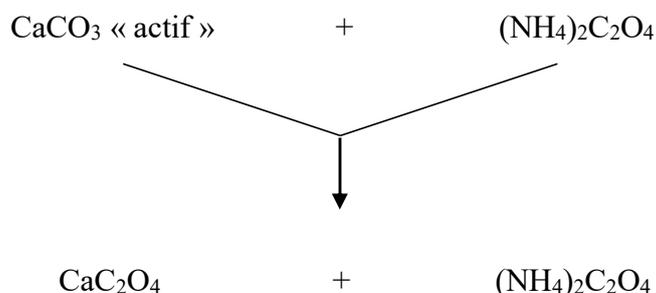
Volume de CO <sub>2</sub> dégagé	Prise de terre : 0,25 g			0,5 g			1 g			2 g			5 g		
	15°	20°	25°	15°	20°	25°	15°	20°	25°	15°	20°	25°	15°	20°	25°
28	17,5	46,5	45,7	23,6	23,2	22,9	11,8	11,5	11,3	5,9	5,8	5,7	2,4	2,35	2,33
28,5	18,3	47,3	46,5	24	23,7	23,3	12	11,8	11,5	6	5,85	5,8	2,45	2,4	2,35
29	49	48,1	47,5	24,5	24	23,7	12,2	12	11,8	6,1	5,95	5,9	2,5	2,45	2,4
29,5	49,8	49	48,3	24,9	24,4	24,1	12,4	12,2	11,9	6,2	6,1	6	2,55	2,5	2,45
30	50,7	49,8	49	25,3	24,9	24,5	12,6	12,4	12,2	6,35	6,2	6,05	2,6	2,55	2,5
30,5	51,6	50,8	50	25,7	25,3	24,9	12,8	12,5	12,4	6,4	6,3	6,2	2,65	2,6	2,55
31	52,5	51,6	50,6	26,1	25,7	25,3	13,1	12,8	12,5	6,6	6,4	6,3	2,67	2,62	2,6
31,5	53,4	52,4	51,5	26,6	26,1	25,7	13,2	13	12,8	6,7	6,5	6,4	2,7	2,65	2,62
32	54,2	53,1	52,3	27	26,6	26,1	13,5	13,2	13	6,8	6,6	6,5	2,75	2,72	2,7
32,5	55,1	54	53,1	27,4	27	26,5	13,7	13,5	13,2	6,9	6,7	6,6	2,8	2,75	2,72
33	55,9	54,8	54	27,8	27,4	26,9	13,9	13,6	13,4	7	6,8	6,7	2,85	2,8	2,75
33,5	56,8	55,5	54,6	28,2	27,8	27,4	14,2	13,8	13,6	7,1	6,9	6,8	2,9	2,85	2,8
34	57,6	56,5	55,5	28,7	28,2	27,8	14,3	14	13,8	7,2	7	6,9	2,95	2,9	2,85
34,5	58,5	57,3	56,5	29,1	28,7	28,2	14,6	14,2	14	7,3	7,1	7	3	2,95	2,9
35	59,3	58,1	57,1	29,5	29	28,6	14,8	14,5	14,2	7,4	7,2	7,1	3,05	3	2,95
35,5	60,2	59	58,1	29,9	29,4	29	15	14,8	14,4	7,5	7,3	7,2	3,07	3,02	3
36	61	59,9	58,9	30,4	29,9	29,4	15,2	14,9	14,6	7,6	7,4	7,3	3,1	3,05	3,03
36,5	61,9	60,7	59,8	30,8	30,3	29,8	15,4	15,1	14,8	7,7	7,5	7,4	3,15	3,1	3,05
37	62,7	61,5	60,5	31,2	30,7	30,2	15,6	15,3	15	7,8	7,6	7,5	3,2	3,15	3,1
37,5	63,6	62,4	61,4	31,6	31	30,6	15,8	15,5	15,2	7,9	7,7	7,6	3,25	3,2	3,15
38	64,4	63,2	62,1	32	31,5	31	16	15,7	15,4	8	7,9	7,7	3,3	3,25	3,2
38,5	65,3	64	63	32,4	31,9	31,5	16,3	16	15,7	8,1	8	7,8	3,35	3,3	3,25
39	66,1	64,9	63,8	32,9	32,4	31,9	16,4	16,1	15,8	8,2	8,1	7,9	3,37	3,35	3,3
39,5	66,9	65,7	64,6	33,3	32,7	32,2	16,6	16,3	16	8,3	8,2	8	3,4	3,37	3,35
40	67,8	66,5	65,3	33,7	33,2	32,7	16,9	16,5	16,3	8,5	8,3	8,1	3,45	3,4	3,4
40,5	68,6	67,4	66,2	34,2	33,6	33,2	17,1	16,7	16,4	8,6	8,4	8,2	3,5	3,45	3,43
41	69,5	68,2	67	34,6	34	33,5	17,3	17	16,7	8,7	8,5	8,3	3,55	3,5	3,45
41,5	70,4	69	67,9	34,9	34,3	33,8	17,5	17,2	16,8	8,8	8,6	8,4	3,6	3,55	3,5
42	71,2	70	68,8	35,4	34,8	34,3	17,7	17,4	17,1	8,9	8,7	8,5	3,65	3,6	3,55
42,5	72,1	70,8	69,5	35,8	35,2	34,7	18	17,7	17,3	9	8,8	8,6	3,7	3,65	3,6
43	73	71,7	70,4	36,2	35,6	35,1	18,2	17,8	17,5	9,1	8,9	8,7	3,75	3,7	3,65
43,5	73,8	72,5	71,2	36,7	36	35,5	18,4	18	17,7	9,2	9	8,8	3,8	3,75	3,7
44	74,6	73,4	72,1	37,1	36,4	36	18,6	18,2	17,9	9,3	9,1	8,9	3,85	3,8	3,75
44,5	75,5	74,1	72,9	37,5	36,9	36,4	18,8	18,5	18,1	9,4	9,2	9	3,87	3,82	3,8
45	76,3	75	73,6	38	37,3	36,7	19	18,6	18,3	9,5	9,3	9,1	3,9	3,85	3,82
45,5	77,1	75,8	74,4	38,4	37,6	37,1	19,2	18,8	18,5	9,6	9,4	9,2	3,95	3,9	3,85
46	78	76,6	75,3	38,8	38,2	37,6	19,5	19,1	18,8	9,7	9,5	9,3	4	3,95	3,9
46,5	78,8	77,5	76,1	39,3	38,6	38	19,6	19,3	18,9	9,8	9,6	9,4	4,05	4	3,95
47	79,7	78,3	77	39,6	39	38,4	19,8	19,5	19,2	10	9,8	9,6	4,07	4,02	4
47,5	80,5	79,1	77,8	40	39,4	38,8	20	19,7	19,4	10,1	9,9	9,7	4,1	4,05	4,02
48	81,3	80	78,6	40,5	39,8	39,2	20,3	19,9	19,6	10,2	10	9,8	4,15	4,1	4,05
48,5	82,1	80,8	79,3	40,8	40,3	39,6	20,5	20,1	19,8	10,3	10,1	9,9	4,2	4,15	4,1
49	83	81,7	80,1	41,4	40,7	40	20,7	20,3	20	10,4	10,2	10	4,25	4,2	4,15
49,5	83,8	82,6	81	41,8	41	40,4	20,9	20,5	20,2	10,5	10,3	10,1	4,3	4,25	4,2
50	84,7	83,3	81,8	42,2	41,5	40,9	21,1	20,7	20,4	10,6	10,4	10,2	4,35	4,3	4,25
50,5	85,7	84,2	82,6	42,7	41,8	41,2	21,3	20,9	20,6	10,7	10,5	10,3	4,4	4,35	4,3
51	86,3	85	83,3	43	42,4	41,7	21,5	21,1	20,8	10,8	10,6	10,4	4,45	4,4	4,35
51,5	87,1	85,8	84,2	43,5	42,7	42	21,7	21,3	21	10,9	10,7	10,5	4,5	4,45	4,4
52	88	86,7	85	43,9	43,2	42,5	22	21,6	21,2	11	10,8	10,6	4,52	4,5	4,45
52,5	88,8	87,5	85,9	44,3	43,6	43	22,2	21,8	21,5	11,1	10,9	10,7	4,55	4,52	4,5

### 6.4.3 Dosage du calcaire actif

#### PRINCIPE

Alors que pour la détermination du calcaire total, on utilise une réaction violente et totale, on pratique ici une réaction modérée qui n'intéresse que les particules calcaires les plus fines ou la surface des particules grossières.

Pour le dosage du calcaire actif, on utilise la propriété du calcium de se combiner aux oxalates pour donner de l'oxalate de calcium insoluble.



L'excès de solution d'oxalate d'ammonium est ensuite dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique.



#### MODE OPERATOIRE

- Peser avec précision 1,00 g de sol (au centigramme près)
- Les introduire dans un flacon de 500 mL
- Ajouter 100 mL de solution d'oxalate d'ammonium N/5 (mesurés avec une fiole jaugée)
- Agiter 2 heures à l'agitateur à plaque
- Filtrer immédiatement dans un bécher en rejetant les 20 premiers mL du filtrat s'ils sont troubles
- Prélever 20 mL du filtrat limpide à la pipette et verser dans un erlenmeyer de 500 mL
- Ajouter 20 mL d'eau distillée et 20 mL de solution d'acide sulfurique 1/5
- Chauffer vers 70-80 °C sur bec bunsen (sans ébullition)
- Doser immédiatement par une solution de permanganate de potassium N/5 dans une burette jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante (soit n mL)
- Doser dans les mêmes conditions 20 mL de la solution d'oxalate d'ammonium N/5 (soit N mL)

#### CALCULS

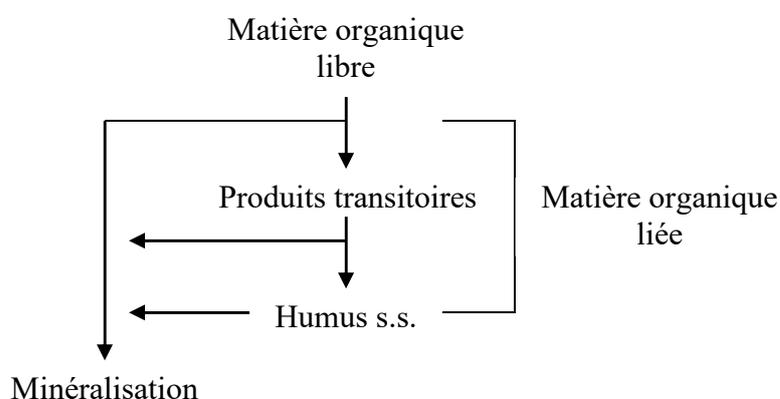
Calculer le % de calcaire actif (% CaCO<sub>3</sub> actif) = (N-n) × 5 qui permet de choisir un porte-greffe résistant au niveau de chlorose correspondant.

## 6.5 Dosage du carbone organique

### 6.5.1 Définition

Les débris végétaux ou les amendements organiques constituent la source essentielle de la matière organique. Ils sont plus ou moins rapidement décomposés par l'activité biologique.

La matière organique est ainsi peu à peu transformée et cela donne naissance, d'une part à des éléments solubles ou gazeux et d'autre part à des complexes humiques (l'humus) qui se décomposeront, se minéraliseront très lentement, très progressivement. Ainsi, la matière organique est une source importante d'éléments nutritifs pour les plantes et la connaissance de sa teneur totale dans le sol renseigne sur sa potentialité fertilisante. La matière organique a également un rôle important dans la « fabrication » des agrégats, autrement dit sur l'élaboration de la structure du sol instable. Les grandes classes de la matière organique du sol peuvent être différenciées de la façon suivante :



Les limites entre les différentes classes sont nécessairement arbitraires : il existe bien entendu de nombreux intermédiaires entre les classes successives.

- La matière organique libre est composée de débris végétaux ou animaux (feuilles mortes, brindilles, résidus de récolte, racines mortes, cellules microbiennes et micro-faune mortes, cadavres animaux) juxtaposés à la fraction minérale dans le sol.
- Les produits transitoires sont issus d'une première décomposition rapide de la matière organique libre ; ils évoluent ensuite en partie pour donner de l'humus, en partie pour libérer des éléments minéraux.
- L'humus s.s. est la fraction stable et très prédominante en conditions normales.
- La matière organique liée est constituée par les produits transitoires et l'humus s.s. et est appelée ainsi parce qu'elle est liée à la fraction minérale du sol (enrobage, imprégnation).

Lors de l'analyse de la matière organique du sol, on opère sur une quantité de terre fine (inférieure à 2 mm) ; on dose donc l'humus *sensu stricto* (plus les produits transitoires).

### 6.5.2 Principe

Le dosage de la matière organique est réalisé à partir du dosage de l'un de ses constituants : le carbone organique. Le carbone organique (C.O.) est estimé à 58 % de la matière organique (M.O.) d'où :  $\% \text{ C.O.} \times 1,724 = \% \text{ M.O.}$

La méthode de détermination du carbone organique est basée sur l'oxydation de ce dernier par le bichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) en milieu acide :



### **6.5.3 Mode opératoire**

#### **MESURE**

Dans un erlenmeyer de 500 mL :

- 2 g de sol pesés au centigramme près (ou 1 g)
- 10 mL de  $K_2Cr_2O_7$  1N mesurés avec précision (burette ou pipette)
- 20 mL de  $H_2SO_4$  concentré (éprouvette)

Agiter 30 secondes et laisser reposer  $\frac{1}{2}$  heure sur plaque de bois ou de polystyrène

Ajouter ensuite :

- 200 mL de  $H_2O$
- 20 mL de  $H_2SO_4$  concentré (éprouvette)
- 10 mL de  $H_3PO_4$  concentré (éprouvette)
- 20 mL de sel de Mohr N/2 ( $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4$ ) mesurés avec précision (pipette)
- 1 à 2 mL de diphénylamine sulfonate de baryum

Titrer par  $K_2Cr_2O_7$  l'excès de réducteur jusqu'au virage violet de l'indicateur

#### **REMARQUE**

Le poids de terre fine à peser varie avec la teneur en matière organique de l'échantillon. Plus la terre est riche en matière organique, plus la prise d'essai sera faible. A la réaction de l'excès de bichromate avec le sel de Mohr, il faut que la chute de ce dernier dans la burette soit comprise entre 4 et 7 mL. Pour la première pesée on se base sur la couleur de la terre ; une terre sombre est généralement riche en M.O., une terre plus claire est moins riche en M.O.

#### **ETALONNAGE DE LA SOLUTION DE SEL DE MOHR**

Le fer ferreux est oxydé par le bichromate en milieu sulfurique. La réaction globale s'écrit :



On utilise comme indicateur d'oxydo-réduction la diphénylamine sulfonate de baryum en solution à 0,1% dans l'acide sulfurique.

En prenant pour référence le titre de la solution de bichromate qui est stable, titrer la solution de sel de Mohr :

- Dans une burette :  $K_2Cr_2O_7$  1N
- Dans un erlenmeyer de 500 mL :
  - 20 mL de solution de sel de Mohr mesurés avec précision
  - 20 mL de  $H_2SO_4$  concentré (éprouvette)
  - 10 mL de  $H_3PO_4$  concentré (éprouvette)
  - 1 mL de diphénylamine sulfonate de baryum
- Verser lentement le bichromate dans la fiole en agitant : la solution prend une couleur verte de plus en plus foncée due à la formation de sulfate de chrome.  
Le dosage est terminé lorsque la solution vire brusquement au violet permanent.

## RESULTATS

- Théoriquement, 1 mL de solution de  $K_2Cr_2O_7$  oxyde 3 mg de C.O. Dans les conditions opératoires utilisées, le taux d'oxydation n'étant que de 77%, 1 mL de  $K_2Cr_2O_7$  correspond à 3,9 mg de C.O.

Exprimer le résultat en % de C.O. (pour mille)

- Calculer le taux de Matière Organique. Comme la matière organique ne renferme que 58 % de carbone, il faut multiplier le % de C.O. par le facteur  $\frac{100}{58}$  1,724 pour avoir le % de M.O.

## 6.6 Dosage de l'azote total

### 6.6.1 Définition

L'azote total d'un sol constitue « la réserve » globale d'azote contenue dans l'humus, réserve dont la rapidité de mobilisation (par minéralisation) est variable suivant le type d'humus. La teneur en azote total est un bon indice de fertilité, à condition d'être interprétée en fonction du rapport C/N. L'intérêt du résultat, généralement limité aux horizons de surface du sol, est ainsi davantage perçu à travers ce calcul du rapport C/N que de sa valeur propre à laquelle on préfère, dans la pratique, celle de l'azote minéral. La méthode la plus couramment employée est la méthode Kjeldhal avec distillation.

### 6.6.2 Principe

Dans le procédé Kjeldhal, la matière organique azotée de l'échantillon est minéralisée (on dit encore attaquée) par l'acide sulfurique concentré, à chaud (action oxydante de  $H_2SO_4$ ). Le carbone et l'hydrogène se dégagent à l'état de dioxyde de carbone (gaz) et d'eau. L'azote transformé en ammoniac est fixé par l'acide sulfurique à l'état de sulfate d'ammoniaque ( $(NH_4)_2SO_4$ ).

Le sulfate de potassium permet d'élever la température d'ébullition de l'acide sulfurique (de 317 à 330 °C) ; le sulfate de cuivre et le sélénium servent de catalyseurs.

Cette première phase s'appelle la « digestion ».

Dans cette phase, les ions ammonium contenus dans le sol sont également captés par l'acide mais pas les ions nitrate et nitrite qui sont transformés en oxydes d'azote volatils ; ils sont par conséquent perdus. Il est vrai que la quantité de nitrates et nitrites dans le sol est ordinairement très réduite par rapport à l'azote total qu'il contient et on la considère comme négligeable.

Dans la méthode dite de Kjeldhal, l'ion  $\text{NH}_4^+$  est ensuite déplacé par l'hydroxyde de sodium, distillé puis fixé par l'acide borique à l'état de borate, lui-même dosé par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  titré. Cette seconde phase s'appelle la distillation.

### **6.6.3 Mode opératoire**

#### **MINERALISATION**

- Dans un matras de 500 mL, introduire dans l'ordre :
  - 10,0 g de sol pesés au décigramme près (éviter de prélever des morceaux de racines)
  - 5 g de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
  - 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pur
  - 2,5 g de mélange de catalyseur ( $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O} + \text{Se}$ )
- Laisser réagir pendant quelques minutes en agitant manuellement
- Placer le matras sur la rampe d'attaque
- Commencer le chauffage à puissance 3 pendant 15 minutes.
- Tourner par intermittence le matras pour que le sol ne colle pas aux parois et éviter de chauffer la partie du matras au-dessus du niveau du liquide
- Poursuivre le chauffage à puissance 2,5 en agitant de temps en temps. Laisser réagir jusqu'à l'oxydation complète de l'échantillon marquée par une décoloration uniforme au gris clair. Le temps de réaction est d'environ 1 heure.
- Laisser refroidir
- Verser de l'eau (attention aux projections) sans trop tarder de manière à décoller le contenu du matras

#### **DISTILLATION**

- Transvaser le contenu du matras dans le ballon à distiller. Le volume ne doit accéder la moitié de celui du ballon
- Introduire une dizaine de billes de verre

- Placer une fiole conique de 500 mL contenant 25 mL de solution d'acide borique 2 % et 6 gouttes d'indicateur de Tashiro en dessous du réfrigérant, la pointe plongeant dans le liquide afin de piéger  $\text{NH}_4^+$  qui sort sous forme gazeuse
- Verser ~150 mL de lessive de soude (éprouvette de 100 mL pleine) dans le ballon puis placer celui-ci le plus rapidement sur l'appareil à distiller
- Distiller jusqu'à recueillir environ 150 mL de condensat

## DOSAGE

Le distillat recueilli est dosé avec une solution d'acide sulfurique 0,1 N jusqu'au retour à la couleur initiale de l'indicateur.

## CALCULS

Sachant qu' 1 mL de la solution d'acide sulfurique correspond à 1,4 mg d'azote, calculer la teneur en azote total en ‰ de N total (pour mille)

Calculer le rapport C/N.

## 6.7 Dosage du phosphore assimilable

### 6.7.1 Définition

Le phosphore présent dans les sols a pour origine principalement les apatites des roches éruptives et métamorphiques. Le phosphore assimilable (ou biodisponible) est l'ensemble du phosphore du système sol-solution qui peut rejoindre la solution sous forme d'ions phosphate pendant un temps compatible avec les possibilités de prélèvements de la vigne en croissance. Les différentes formes d'anions métabolisés par la vigne se présentent sous les formes  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Certains ions sont dissous dans la solution du sol, d'autres sont plus ou moins fortement adsorbés sur les surfaces externes des minéraux argileux et sur les surfaces sorbantes des oxy-hydroxydes de fer et/ou d'aluminium, et susceptibles d'être rapidement mobilisables vers la solution.

### 6.7.2 Principe

La méthode Olsen consiste à extraire les phosphates par une solution de bicarbonate de sodium à 0,5 M et à pH = 8,5. Le dosage est effectué par spectrophotométrie du complexe phosphomolybdique (coloration bleue) à 720 nm.

### 6.7.3 Mode opératoire

## EXTRACTION

- Peser 5,00 g (au centigramme près) de sol et les introduire dans un flacon de 250 mL
- Ajouter 100 mL de la solution d'extraction de bicarbonate de sodium à 0,5 M et pH = 8,5
- Mettre sous agitation pendant 30 min

## PREPARATION DES SOLUTIONS STANDARDS

- Prélever à la pipette 10 mL de la solution mère de P à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  et les mettre dans une fiole jaugée de 100 mL
- Compléter au niveau avec de l'eau distillée et homogénéiser
- Prélever à la pipette 10 mL de cette solution et les mettre dans une fiole jaugée de 250 mL
- Compléter au niveau avec la solution d'extraction de bicarbonate de sodium
- Prélever à la pipette 0, 5, 10, 15, 20 et 25 mL de cette nouvelle solution et les introduire dans des fioles jaugées de 50 mL.
- Compléter au volume avec la solution d'extraction et homogénéiser

Les concentrations obtenues pour les solutions standards sont respectivement :

Solution standard 1	$0,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}$
Solution standard 2	$0,4 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}$
Solution standard 3	$0,8 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}$
Solution standard 4	$1,2 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}$
Solution standard 5	$1,6 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}$
Solution standard 6	$2,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}$

## DOSAGE

- Filtrer sur papier Whatman 42 l'échantillon de sol après agitation
- Prélever à la pipette 5 mL des solutions standards et les introduire dans des tubes à essais de 20 mL au moins
- Prélever à la pipette 5 mL de l'échantillon filtré et les introduire dans un tube à essais de 20 mL au moins. Au cas où l'échantillon serait hors de la gamme d'étalonnage, préparer 1 dilution au  $\frac{1}{2}$  de celui-ci avec la solution d'extraction
- Ajouter **avec précaution** (en versant doucement à cause du dégagement de  $\text{CO}_2$ ) 5 mL de la solution de réactif (contenant le molybdate) dans chaque tube
- Homogénéiser et attendre au moins une heure que la couleur bleue atteigne son maximum
- Mesurer l'absorbance de la solution contenue dans chaque tube à 720 nm au spectrophotomètre

## CALCULS

- Tracer la courbe DO = ([solutions standards])
- Déterminer la concentration en P dans la solution d'extraction
- Donner le résultat en ppm de P et de  $\text{P}_2\text{O}_5$  pour le sol

## 6.8 Capacité d'échange cationique par l'acétate d'ammonium

### 6.8.1 Définition

La capacité d'échange cationique (CEC) d'un sol est la quantité totale de cations que ce sol peut adsorber sur son complexe et échanger avec la solution environnante dans des conditions de pH bien définies.

Pour un sol, la capacité d'échange cationique est due aux substances colloïdales (au sens large) portant des charges négatives telles que les minéraux argileux et les substances humiques. Ces substances constituent le complexe adsorbant ou complexe argilo-humique. Elle est en relation avec la surface spécifique et les charges permanentes et variables de ces substances.

On peut exprimer la CEC en milliéquivalents (meq) pour 100 g de sol. Les valeurs sont alors données en charges électriques unitaires :

$$\text{Un milliéquivalent} = \frac{\text{Poids atomique}}{\text{Valence}} \times 10^{-3}$$

Si par exemple, la CEC d'un sol est de 20 méq.100g<sup>-1</sup> et que le sol est saturé par du calcium,

cela veut dire que l'échantillon retient  $\frac{20 \times 40}{2} = 400$  mg de calcium par 100 g, alors que si

c'est le potassium qui sature l'échantillon, celui-ci retient  $\frac{20 \times 39}{1} = 780$  mg de potassium par 100g.

Selon le système international d'unités, la CEC est exprimée en centimole de charges positives par kilogramme (cmol<sup>+</sup>.kg<sup>-1</sup>), sachant que numériquement, 1 meq.100 g<sup>-1</sup> = 1 cmol<sup>+</sup>.kg<sup>-1</sup>.

### 6.8.2 Origine de la capacité d'échange

La capacité d'échange cationique des minéraux argileux phylliteux (structure en feuillets) trouve principalement son origine dans les déficits de charges permanentes provoqués par des substitutions isomorphiques dans les réseaux cristallins, un cation étant remplacé par un autre de valence inférieure. Ces substitutions peuvent être en position tétraédrique (Si<sup>4+</sup> remplacé par Al<sup>3+</sup>) ou octaédrique (Al<sup>3+</sup> remplacé par Mg<sup>2+</sup> ou Fe<sup>2+</sup>). Ce type de substitution est la cause essentielle des fortes CEC caractéristiques des minéraux argileux de type 2/1. Ces charges induites par substitution, indépendantes du pH et de la force ionique sont des charges permanentes. En bordure de minéraux argileux, la rupture du réseau cristallin est à l'origine de charges variables : la dissociation éventuelle de groupements -OH des tétraèdres de silice peut induire des charges variables. La capacité d'échange cationique des composés humiques dépend de leurs nombreux groupements fonctionnels -COOH et -OH (plus ou moins dissociés suivant le pH) périphériques des macromolécules organiques. Les composés humiques ont une capacité d'échange plus élevée que les argiles, et constituée uniquement de charges variables qui d'une manière générale se développent de plus en plus au fur et à mesure que le pH augmente.

Dans ce contexte, trois valeurs sont définies pour caractériser un sol :

**La capacité d'échange** : CEC (capacité d'échange cationique) ou T = la quantité maximum des cations qu'un sol peut adsorber (exprimée pour 100 g de sol) ; en signalant que :

- La capacité d'échange maximale T est celle déterminée classiquement à l'acétate d'ammonium à pH = 7
- La capacité d'échange effective est celle déterminée au pH et à la concentration ionique du sol ;

**La somme des « cations » échangeables** : S représentée essentiellement par Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> qui est également un ion adsorbé par le sol mais étant très minoritaire, il n'est pas pris en compte), (T – S) représente les sites chargés négativement libres pour fixer les ions H<sup>+</sup> et Al<sup>3+</sup>, qui définissent l'acidité potentielle ou acidité d'échange. En sachant toutefois que Al<sup>3+</sup> n'apparaît qu'à pH-eau inférieur à environ 5,5.

Le **taux de saturation** en cations :  $V = \frac{S}{T} \%$

D'une façon générale, la somme des cations échangeables peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\Sigma M^{x+} = \underbrace{Na^+ + K^+ + Mg^{2+} + Ca^{2+}}_S + \underbrace{Al^{3+} + H^+}_{\text{acidité d'échange}}$$

### **6.8.3 Principe**

La détermination de la capacité d'échange d'un sol consiste à saturer son complexe adsorbant par un ion assez efficace équilibrant la charge de l'échangeur et cependant assez facile à déplacer par la suite, et finalement à doser par les méthodes courantes de laboratoire.

Cette détermination est assez délicate car elle varie en fonction du pH. En effet, le pH modifie les dissociations ioniques notamment pour les ions OH<sup>-</sup> liés au réseau des silicates et pour les groupements carboxyliques (-COOH) et phénoliques (-OH) de l'humus. C'est la raison pour laquelle la détermination de la CEC est très souvent réalisée à un pH bien déterminé.

Ainsi lors de la manip, les cations échangeables (et l'hydrogène) du complexe adsorbant sont tout d'abord déplacés par une solution mono-ionique. Le filtrat recueilli contient donc tous les cations (et l'hydrogène) déplacés par la solution mono-ionique. C'est à partir de ce filtrat que l'on déterminera les cations échangeables (et l'acidité d'échange).

#### **6.8.4 Mode opératoire**

- Obturer une allonge à percolation avec un média filtrant et la mettre sur son portoir
- Sous l'allonge, disposer un bécher de 400 mL afin de recueillir le percolat
- Introduire 10,0 g (pesés au décigramme près) de sol dans l'allonge
- Verser très lentement, en utilisant une baguette de verre, 250 mL d'acétate d'ammonium 1N mesurés avec une fiole jaugée et versés dans un bécher
- Noter la durée de la percolation qui donne une indication sur la perméabilité du sol
- Lorsque la percolation est terminée, **homogénéiser** le contenu du bécher avec une baguette de verre
- Transférer dans un flacon de 125 mL une partie du percolat
- Transférer dans un autre flacon de 125 mL la dilution au 1/25<sup>ème</sup> du percolat (préparée en pipetant 4 mL de solution et en complétant avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 mL et en homogénéisant)
- Ne pas oublier de mentionner sur les flacons les références du sol et du percolat (dilué D et non dilué ND)
- **Lorsque le sol est calcaire**, la percolation est poursuivie avec 50 mL supplémentaires d'acétate d'ammonium (mesurés avec une fiole jaugée et versés dans un bécher). Ce percolat est recueilli séparément et servira uniquement à une détermination du calcium sur une dilution au 1/25<sup>ème</sup> (D2)

Le dosage des cations sera ensuite effectué par spectrophotométrie de flamme (émission et absorption) :  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sur la dilution et  $\text{K}^+$  sur le percolat non dilué.

#### **6.8.5 Calculs**

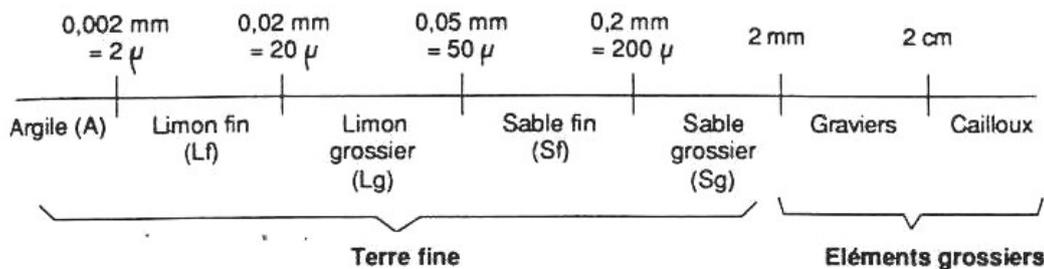
- Calculer les concentrations en cations échangeables  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , et  $\text{K}^+$  en meq/100 g
- Exprimer les résultats en ‰ (pour mille) de chaux CaO, magnésie MgO et potasse  $\text{K}_2\text{O}$
- Calculer le pourcentage des cations dans la CEC

## 6.9 Analyse granulométrique : texture des sols

### 6.9.1 Principe

Le but de cette manipulation est de déterminer les 5 différentes classes granulométriques de la fraction minérale d'un sol (terre fine) : pour cela, il est nécessaire d'obtenir une suspension dans laquelle les particules se trouvent parfaitement individualisées. Il faut donc supprimer les agrégats qui sont dus soit à la matière humique, soit à l'intervention des cations flocculants comme  $\text{Ca}^{2+}$ , d'où les deux parties de la manipulation :

- Préparation de l'échantillon qui consiste à supprimer les agrégats (destruction de la matière organique et défloculation des argiles)
- Classement des particules en utilisant la relation de Stokes qui donne la vitesse de sédimentation en fonction du rayon d'une particule sphérique :  $v = k \times r^2$



### 6.9.2 Mode opératoire

#### PREPARATION DE L'ECHANTILLON LA VEILLE

- Dans un bécher de 400 mL, on introduit 20,0 g de sol (pesée au décigramme près) et 100 mL d'eau oxygénée à 20 volumes
- Laisser l'attaque s'effectuer à froid ½ heure environ (remuer fréquemment avec une baguette de verre)
- Porter ensuite au bain-marie ou sur un bain de sable (70 °C environ) pendant le temps nécessaire (2 heures minimum). Remuer fréquemment jusqu'à disparition complète de la mousse. Ne pas arriver à la siccité totale
- Ajouter 40 mL d'hexamétaphosphate de sodium à 50 g/L. Compléter à 200 mL, bien homogénéiser
- Passer aux ultrasons 4 minutes

#### ANALYSE GRANULOMETRIQUE

- Tamiser sous l'eau à 200 µ et 50 µ au-dessus d'une éprouvette graduée de 1 L.

Les capsules de verre ou d'aluminium préalablement pesées à vide (**au centigramme près**). Après décantation, les capsules sont mises à sécher sur le bain de sable ou le bain marie et, après refroidissement, pesées à nouveau au **centigramme près**.

- La suspension limono-argileuse recueillie dans l'éprouvette lors du tamisage est complétée à 1 L et homogénéisée par retournement (trois fois).
- Choisir le temps et la profondeur auxquels se fera le prélèvement des argiles à partir de la relation : 8 heures ↔ 10 cm. On adopte souvent la durée de sédimentation minimale de 2 heures (prélèvement à 2,5 cm de profondeur).
- Peser les trois piluliers (prévus pour les trois prélèvements) dûment référencés, à vide, **au dixième de milligramme près**.
- Au temps fixé précédemment, prélever à la pipette de Robinson (25 mL) les argiles à la profondeur voulue et les recueillir dans le pilulier correspondant à la fraction A.
- Remettre complètement en suspension le contenu de l'éprouvette pendant environ une minute et prélever la fraction argile + limons fins à 10 cm à 4 minutes 15 secondes de sédimentation. Recueillir la fraction dans le pilulier correspondant à la fraction A + LF.
- Remettre complètement en suspension le contenu de l'éprouvette pendant une minute environ et prélever les argiles + limons fins + limons grossiers à 12,6 cm à 1 minute de sédimentation et recueillir le prélèvement dans le pilulier correspondant A + LF + LG.
- Les piluliers sont maintenus dans une étuve à 105 °C jusqu'à siccité de leur contenu, soit 24 heures environ : effectuer les pesées **au dixième de milligramme près**, après refroidissement.

## CALCULS

- A partir des 5 fractions isolées, donner en pourcentage la composition granulométrique de l'échantillon (sans oublier de tenir compte de la masse d'hexamétaphosphate de sodium présent dans les piluliers pour les trois fractions les plus fines).
- Situer l'échantillon sur le triangle des textures.
- Les résultats de l'analyse granulométrique permettent d'obtenir une estimation de la **capacité de rétention en eau du sol** (CR), à défaut d'une mesure directe. Plusieurs auteurs ont proposé des corrélations empiriques à partir de l'étude d'un grand nombre de sols de nature très diverse :

a)  $CR = 10 + 0,55.A$

b)  $CR = 0,023.S + 0,25.L + 0,61.A$

c) Si  $CR < 20\%$   $CR = 7,35 + 0,14.L + 0,51.A$   
Si  $CR > 20\%$  :  $CR = 5,47 + 0,16.L + 0,59.A$

Où S, L et A désignent respectivement les pourcentages de sables, de limons et d'argiles.

Calculer la capacité de rétention en eau de l'échantillon de sol avec les différentes corrélations.

## SECTION 7 PRATIQUES ŒNOLOGIQUES I

### Identification des troubles et essais de collage

---

#### 7.1 Caractérisation d'un trouble ou d'un dépôt

**Objectif : déterminer l'origine d'un trouble ou d'un dépôt dans le vin**

##### 7.1.2 Principe

C'est un problème qui se pose couramment à l'œnologue : en présence d'un vin ayant déposé, définir la nature et les causes du trouble. Les circonstances de l'apparition du dépôt aident déjà à son identification. Une analyse sommaire, un examen microscopique et quelques réactions permettent de formuler un diagnostic. L'observation au microscope appliquée au dépôt, après centrifugation si cela est nécessaire, détermine 3 catégories :

- Dépôt organisé (bactéries, levures)
- Dépôt cristallisé (tartre)
- Dépôt amorphe sous forme de particules à contours imprécis, d'amas (précipitations diverses)

#### LES DIVERSES MALADIES DE LA LIMPIDITE DES VINS

Troubles oxydasiques	
Troubles microbiens	
Levures, bactéries, notamment bactéries lactiques	
Troubles chimiques	
VINS BLANCS et ROSES Casse ferrique Casse cuivreuse colorante Précipitations tartriques Casse protéique	VINS ROUGES Casse ferrique Précipitations de matière Précipitations tartriques

#### LES PRINCIPAUX TROUBLES

- **Altérations de la couleur : par oxydation, madérisation, fer, vin blanc taché, ...**
- **Troubles ou dépôts amorphes :**

**Casse oxydasique :** l'action de l'oxygène sur les polyphénols du vin en présence de polyphénols oxydases donne une teinte brune au vin.

**Casses métalliques** : La casse ferrique apparaît après une aération et est due à un excès de fer (casse bleue dans les vins rouges et casse blanche dans les vins blancs). La casse cuivreuse apparaît à l'abri de l'air et est due à un excès de cuivre.

**Casses protéiques** : c'est une floculation des protéines naturelles des vins blancs, à la suite d'une dénaturation des protéines, souvent suite à une augmentation de la température.

**Dépôts de gommes ou mucilages** : pectines, dextrans

**Résidus de traitement** : phytate-fer, ferrocyanure-fer, bentonite, gomme arabique, suite à l'addition AMT...

- **Troubles ou dépôts organisés**

**Dépôts cristallins** : les précipitations cristallines de bitartrate de potassium et de tartrate neutre de calcium apparaissent après un refroidissement ou seulement parois à la longue dans les vins mis jeunes en bouteille.

**Troubles microbiens** : levures (voile, fleur, refermentation, Acetobacter, bactéries lactiques (coques ou bacilles)

**Résidus de traitement** : Kieselguhr, amiante, cellulose, perlite

### 7.1.2 Etude du dépôt

#### **SEPARATION DU TROUBLE OU DU DEPOT**

Le dépôt peut être récupéré par centrifugation ou par filtration à la rigueur (dans le cas de cristaux), et remis en suspension dans un peu d'eau distillée.

#### **A - PREPARATION DE L'ECHANTILLON**

Centrifuger **40 mL** de vin à 3000 rpm pendant 5 minutes.  
Prendre le culot dans 8 mL d'eau distillée

#### **B - OBSERVATION AU MICROSCOPE DU DEPOT**

Mettre une goutte de solution entre lame et lamelle et observer au microscope au plus faible grossissement dans un premier temps.

Cette observation permet de différencier :

- Les dépôts cristallins : le tartrate neutre de calcium présente des cristaux en forme d'aiguille et le bitartrate de potassium des cristaux plus carrés
- Les dépôts amorphes
- Les troubles microbiologiques
- Les résidus de traitement (cellulose, perlite...)

Un dépôt cristallin apparaît translucide, vitreux, brillant et avec des formes géométriques nettes et régulières et anguleuses quand il s'agit de précipitations tartriques. Si les particules présentent des formes très différentes les unes des autres, il s'agit de résidus de traitement (perlite, diatomées...)

Les dépôts amorphes sont des masses informes, opaques. Les protéines apparaissent colorées en brun, plus ou moins foncée suivant l'épaisseur du dépôt, assemblées par amas. Les précipitations métalliques sont composées de fines particules noires plus ou moins regroupées à l'aspect pulvérulent. La matière colorante est rouge, amorphe, parfois en forme de plaquettes très fines ou en aiguilles.

Les microorganismes sont reconnaissables à leurs formes sphériques, ovoïdes ou allongées, isolées ou sous forme de chaînettes.

### ***Tests d'identification physico-chimique du trouble ou du dépôt d'un vin : (voir schéma récapitulatif)***

Ces tests sont réalisés pour confirmer le diagnostic effectué précédemment par observation microscopique

Il faut être organisé et faire les tests toujours dans le même ordre : commencer toujours par le test à l'acide chlorhydrique  $\frac{1}{2}$ , puis le test à l'alcool et le test à l'eau bouillante.

- Dépôts cristallins

### **CAS D'UN DEPOT D'HYDROGENOTRATRATE DE POTASSIUM**

Faire les 3 tests initiaux avec le dépôt remis en solution dans l'eau distillée. Dans 3 tubes à essais, ajouter :

- tube 1 : 1 mL HCl  $\frac{1}{2}$  + 1 mL de dépôt
- tube 2 : 1 mL d'alcool pur + 1 mL de dépôt
- tube 3 : 1 mL d'eau bouillante + 1 mL de dépôt

Vortexer les 3 tubes. Si le dépôt se solubilise dans HCl  $\frac{1}{2}$ , dans l'eau bouillante mais pas dans l'alcool c'est de l'hydrogénéotartrate de potassium. Pour confirmer cette hypothèse, ajouter une pincée de métavanate d'ammonium aux cristaux solubilisés dans l'eau (tube 3). Une coloration orange confirme la présence d'hydrogénéotartrate de potassium.

### **CAS D'UN DEPOT DE TARTRATE NEUTRE DE CALCIUM**

Même protocole que précédemment. Le tartrate neutre de calcium est soluble dans HCl  $\frac{1}{2}$ , l'alcool pur mais pas dans l'eau bouillante. Un test spécifique est disponible : ajouter 5 gouttes d'oxalate d'ammonium aux cristaux solubilisés (tube avec HCl) puis 5 gouttes d'ammoniac pure. La formation d'un trouble blanchâtre d'oxalate de calcium confirme la présence de tartrate neutre de calcium.

- Troubles amorphes

Faire les 3 tests initiaux avec le dépôt remis en solution dans l'eau distillée. Dans 3 tubes à essais, ajouter :

- tube 1 : 1 mL HCl ½ + 1 mL de dépôt
- tube 2 : 1 mL d'alcool pur + 1 mL de dépôt
- tube 3 : 1 mL d'eau bouillante + 1 mL de dépôt

#### **CASSE PROTEIQUE :**

Le dépôt ne doit se dissoudre ni dans l'acide, ni dans l'alcool mais doit disparaître dans l'eau bouillante. Une coloration spécifique apparaît en présence de bleu de Coomassie (+ 0,5 mL). La présence d'une casse protéique est confirmée.

#### **CASSES METALLIQUES :**

Si l'essai de solubilité dans l'acide est positif, il s'agit d'une casse métallique. D'autres tests sont nécessaires pour identifier s'il s'agit d'une casse ferrique ou cuivreuse.

##### ***Casse ferrique :***

Prélever 1 mL de dépôt en solution

Ajouter 1 mL d'HCl ½ et vortexer

Ajouter 2 mL de sulfocyanure de potassium à 5%.

Si la solution se colore en rouge, il s'agit d'une casse ferrique.

##### ***Casse cuivreuse :***

Prendre un 1 mL de la solution aqueuse de dépôt

Ajouter 1 mL d'acétate de sodium à 5%, quelques cristaux de chlorhydrate d'hydroxylamine puis vortexer

Ajouter 1 mL de 2,2-diquinolyne à 0,02%. Vortexer.

Il doit se former une coloration violette pour confirmer la présence d'une casse cuivreuse.

#### **DEPOT DE MATIERE COLORANTE**

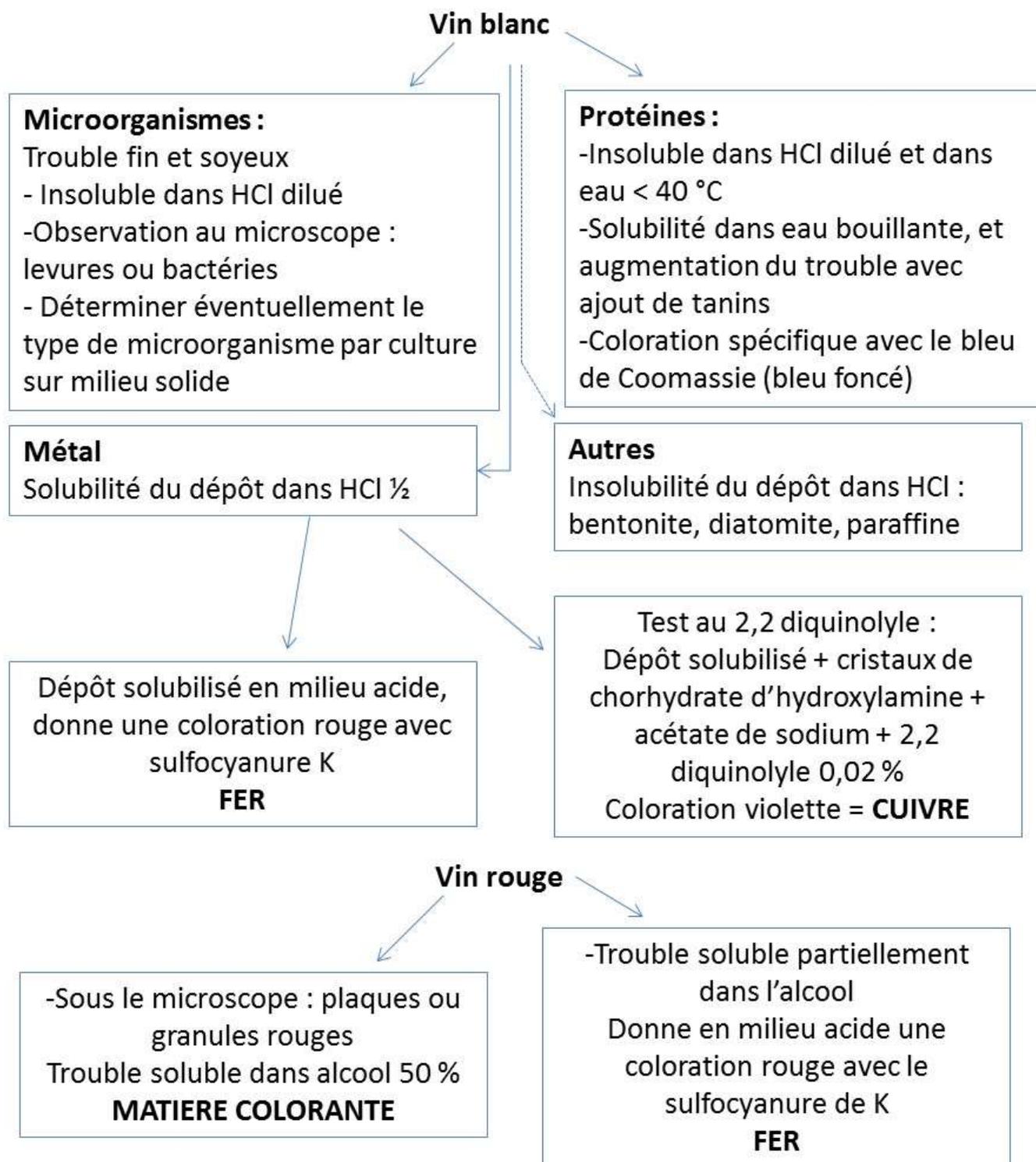
Le dépôt ne doit pas se dissoudre dans HCl au ½. Mais il se dissout dans l'alcool.

- Dépôt microbiologique

Si les 3 tests initiaux répondent tous par la négative, nous pouvons conclure qu'il s'agit de levures ou de bactéries.

# Voies de caractérisation de troubles amorphes

- 1- Centrifuger 40 ml de vin pendant 5 min à 3000 rpm
- 2- Reprendre le culot dans 8 ml d'eau distillée
- 3- Tester la solubilité du dépôt dans HCl ½



## Voies de caractérisation de troubles cristallins

### TARTRATE NEUTRE DE Ca-

- Cristaux en forme d'aiguille
- Goût neutre
- Cristaux insolubles dans l'eau chaude
- (Cristaux + HCl)+ oxalate NH<sub>4</sub><sup>+</sup> NaOH jusqu'à neutralité >> anneau blanc = oxalate de Ca

### BITARTRATE DE K

- Cristaux très polarisants
- Goût acide
- Cristaux solubles dans l'eau chaude
- Cristaux solubilisés + métavanate d'NH<sub>4</sub> >> Orange

### MUCATE de Ca

- Cristaux en forme de petit oursin

## 7.2 Essais de collage des vins

### 7.2.1 Définition – Principe

Le collage est un procédé physico-chimique de clarification et de stabilisation des vins mettant en jeu des phénomènes d'interaction entre les adjuvants de collage (protéines, bentonites, les sols de silice...) et des composés colloïdaux du vin qui le troublent ou sont susceptibles de le troubler. Les adjuvants ont des propriétés et des comportements différents vis-à-vis de ces composés colloïdaux et selon le type de vin. Les mécanismes du collage sont complexes et peuvent être divisés en deux étapes :

- une étape de floculation, à l'origine de la formation d'agrégats qui grossissent, s'assemblent et précipitent
- une étape de sédimentation, de clarification, correspondant à l'élimination des matières en suspension dans le vin

Le collage des vins a une incidence sur ses propriétés organoleptiques et notamment sur les caractéristiques phénoliques des vins. De par la diversité de comportement des colles et des vins, le collage est difficile à maîtriser. Des essais préalables en laboratoire sont donc indispensables pour apprécier le comportement de plusieurs produits et éventuellement à plusieurs doses et pour obtenir une bonne adéquation entre la colle et le vin en fonction du produit à traiter et de celui à obtenir.

## **I. Pourquoi coller un vin ?**

Le collage des vins peut avoir plusieurs objectifs :

- Clarifier les vins avant la filtration pour la mise en bouteilles
- Stabiliser durablement les vins en précipitant les éléments instables, et en réduisant les risques ultérieurs en bouteilles (casses protéiques, métalliques...)
- Améliorer les caractéristiques organoleptiques des vins en atténuant ou en éliminant les composés oxydés, l'amertume, en améliorant la structure tannique des vins
- Augmenter la filtrabilité des vins et l'efficacité des traitements ultérieurs

## **II. Les tests préalables au collage**

Ces tests ont pour but de définir les conditions dans lesquelles doit être appliqué le traitement de collage.

### **La dégustation :**

L'impidité, couleur, intensité aromatique, astringence excessive, amertume éventuelle peuvent nous indiquer les colles et une fourchette de doses à tester. Le choix de l'adjuvant de collage sera également raisonné en fonction de l'objectif recherché : amélioration organoleptique, stabilisation physico-chimique, traitement contre l'oxydation...

### **Le sulfitage :**

Amener la teneur en SO<sub>2</sub> libre à 25-30 mg/L pour prévenir d'éventuels problèmes dus à l'aération du vin.

### **Test de tenue à l'air :**

Une bouteille en vidange pendant 4 à 5 jours suffit pour voir d'éventuels problèmes microbiens ou de casse oxydasique.

### **Taux de CO<sub>2</sub> dissous :**

Une teneur élevée en CO<sub>2</sub> dissous gêne la sédimentation des colles, et peut parfois provoquer un surcollage, du à un excès de colle. Si la teneur en CO<sub>2</sub> est supérieure à 400 mg/L, il y aura dégazage au moment de l'ajout de colle. Il est alors indispensable d'effectuer un dégazage par soutirage à l'air ou par injection d'azote. Si l'on souhaite conserver le gaz carbonique, il faut se placer à une température maximale de 8°C. Au laboratoire, un transvasement d'un récipient à un autre suffit.

### **Test de tenue à la chaleur :**

C'est à l'heure actuelle le test le plus utilisé pour estimer la stabilité des vins blancs et rosés vis-à-vis de la casse protéique.

1. Remplir au  $\frac{3}{4}$  un tube à essai à vis avec du vin filtré. Visser sans bloquer.
2. Placer le tube dans un bain marie à 80 °C pendant 30 min. Après 12 h, comparer les turbidités des tubes chauffés et du témoin en faisant la différence.

Si la différence est supérieure à 2 NTU, le vin n'est pas stable et un traitement à la bentonite est nécessaire. D'autres tests existent comme le bentotest (utilisé lors de ce TP).

### Test de tenue au froid :

Ce test est plutôt réalisé après le collage, et renseigne sur la stabilité tartrique et la stabilité de la matière colorante des vins. Le vin filtré sur membrane est laissé dans un flacon étroit, rempli à moitié puis bouché à -5°C pendant 5 jours. Observer d'éventuelles précipitations de matières colorantes et de cristaux d'hydrogéné-tartrate de potassium. La présence de quelques cristaux suffit à conclure que le vin est instable. A long terme, la matière colorante finit par tomber.

## LES ESSAIS DE COLLAGE

### Introduction

Pour réduire l'essai à une ou deux colles, on utilise des colles en fonction de la couleur du vin à traiter (tableau 1) et de la nature même du vin.

Tableau 1 : Principales colles utilisées pour les vins blancs, rosés et rouges et doses moyennes d'utilisation pour les collages

VINS ROUGES	VINS BLANCS / VINS ROSES
Gélatine (10-20 g/hl)	Colle de poisson (1-5 g/hl)
Albumine d'œuf (8-10 g/hl)	Caséine (20-40 g/hl)
Bentonite (20-40 g/hl)	Bentonite (20-40 g/hl)
Protéines végétales (2-30 g/hl)	

#### Vins blancs / rosés

On utilise surtout la caséine pour éliminer les polyphénols oxydés ou oxydables et la bentonite pour son action sur les protéines, ou une association des deux colles. La colle de poisson est réservée aux vins blancs de qualité, car elle est plus chère, difficile à mettre en œuvre, sédimente mal et donne des lies peu tassées. Mais elle confère aux vins une limpidité et un brillant inégalé. Elle est insensible aux basses températures (<8°C). Elle nécessite peu de tanins pour flocculer (pas de surcollage aux doses utilisées).

La PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) a la particularité d'adsorber une partie des composés phénoliques, notamment des composés responsables de l'astringence, de l'amertume et du brunissement des vins.

#### Vins rouges

Les colles principalement utilisées pour les vins rouges de qualité sont les gélatines et l'albumine d'œuf (tableau 1). L'addition de bentonite peut dans certains cas améliorer la clarification mais son emploi devra rester limité si on ne veut pas aplatir le vin.

Pour des raisons de santé publique, les industriels proposent maintenant des colles végétales obtenues à partir du pois et du gluten de blé.

# ESSAIS DE COLLAGE DES VINS BLANCS

## TESTS PREALABLES

- 1) S'assurer que le vin a été sulfité : doser le SO<sub>2</sub> libre et total sur le vin brut (dosage potentiométrique)
- 2) Faire un test de présence de protéines (Bentotest : voir fiche)

## PREPARATION DES SOLUTIONS

ADJUVANT	PRESENTATION	PREPARATION
SO <sub>2</sub>	Liquide	Préparer une solution à 1,8 g/L (200 mL)
PVPP (Viniclar®)	Poudre	Préparer une solution (50 mL) à 100 g/L Faire gonfler 1h
Caséine soluble	Poudre	Préparer une solution à 100 g/L (20 mL) Dissoudre dans l'eau tiède Conservation au frigo (3j)
Bentonite (Microcol® Alpha)	Poudre	Préparer une solution à 70 g/L (100 mL) Conservation 6 mois à l'abri de la lumière
Colle de poisson	Poudre	Préparer une solution à 10 g/L (25 mL) dans l'eau acidifiée à 7 g/L d'acide citrique. Conservation au frigo (7 j).
Colle végétale (Vegecoll®)	Poudre	Préparer 50 mL d'une solution à 100 g/L.
Bentonite + colle de poisson		

**Remarque** : l'introduction de bentonite et d'une colle protéique en même temps est judicieuse pour un collage dégrossissant pendant la fermentation, sinon il vaut mieux introduire une colle après l'autre en soutirant entre les 2 collages. Lors de collage à la bentonite en association avec une colle protéique, **introduire la colle protéique en premier, agiter, puis injecter la bentonite**. Transvaser ensuite le vin 2 à 3 fois dans un béccher de façon à bien homogénéiser l'ensemble.

Dans la pratique, la bentonite est ajoutée 3 à 4 h après l'introduction de la caséine dans le cas des VB, et 4 jours après la colle protéique dans le cas des VR.

## OBSERVATION ANALYTIQUE DU VIN

- Prélever **400 mL** de vin brut
- Ajuster le SO<sub>2</sub> libre à 30 mg/L de SO<sub>2</sub> libre
- Filtrer 50 mL de vin sulfité dans un erlen et mesurer la turbidité, la DO à 420 nm.

**Conserver ces valeurs pour l'interprétation des résultats.**

## MISE EN ŒUVRE DU COLLAGE

Remplir 6 tubes à essais avec **50 mL** de vin sulfité non filtré.

Pour chaque tube, prélever le volume approprié de colle et l'injecter dans le vin à l'aide d'une pipette ou d'une micropipette, bien homogénéiser puis boucher ou couvrir avec du parafilm.

- Tube A : Ajouter 60 g/hl de bentonite
- Tube B : Ajouter 20 g/hl de PVPP
- Tube C : Ajouter 20 g/hl de caséine
- Tube D : Ajouter 2 g/hl de colle de poisson
- Tube E : Ajouter 7 g/hl de colle végétale
- Tube F : Ajouter 1 g/hl de colle de poisson /40 g/hl de bentonite

## INTERPRETATION :

- a) Faire une observation visuelle : du dépôt formé (hauteur et tassement des lies), couleur et aspect du précipité (tassé, floconneux, volumineux), aspect du surnageant (plus clair, moins trouble...). Séparer le vin clair des lies en prélevant délicatement le surnageant avec une pipette.
- b) Filtrer les surnageants. Les analyses à effectuer sont répertoriées dans ce tableau

Analyses
A420 nm
Turbidité
Faire un bentotest sur la modalité Bentonite (si présence de protéines sur le vin de départ)

Dans la pratique, analyse sensorielle des différentes modalités de collage

Résultats : Rapporter les résultats dans un tableau récapitulatif et conclure en donnant une recommandation sur le choix de la colle à utiliser pour clarifier et éliminer les polyphénols oxydés.

## ESSAIS DE COLLAGE DES VINS ROUGES

### PREPARATION DES COLLES

ADJUVANT	PRESENTATION	PREPARATION
SO <sub>2</sub>	Liquide	Solution à 1,8 g/L
Gélatine (Gélatine extra n°1)	Poudre	Préparer 50 mL d'une solution à 50 g/L
Albumine d'œuf (Ovoclaryl®)	Poudre	Préparer 100 mL d'une solution à 100 g/L
Colle végétale (Vegecoll®)	Poudre	Préparer 50 mL d'une solution à 100 g/L.
Bentonite + Gélatine		Solution à 70 g/L. Faire gonfler pendant 1h.

\* L'addition d'un peu de sel de sodium facilite la dissolution de l'albumine d'œuf.

### OBSERVATION ANALYTIQUE DU VIN

- Doser le SO<sub>2</sub> libre et total
- Prélever **900 mL** de vin
- Ajuster le SO<sub>2</sub> libre à 30 mg/L à l'aide de la solution diluée (1,8 g/L)
- Filtrer 50 mL de vin brut dans un erlen
- Mesurer la turbidité sur le filtrat
- Mesurer l'absorbance à 420 nm, à 520 nm et 620 nm du vin sous 1 mm de parcours optique par rapport à l'eau distillée. Mesurer la DO à 280 nm après avoir dilué 100 fois le vin au préalable.
- Mesurer les coordonnées tristimulaires (Lab)

**Conserver ces valeurs pour l'interprétation des résultats.**

### MISE EN ŒUVRE DU COLLAGE

Remplir 4 flacons avec 200 mL de vin sulfité

Prélever le volume approprié de colle et l'injecter dans le vin grâce à une pipette.

Sur 4 tubes de 200 mL, ajouter :

- 8 g/hl de gélatine
- 3 g/hl d'albumine d'œuf
- 7 g/hl de colle végétale
- 8 g/hl de gélatine et 30 g/hl de bentonite

Bien homogénéiser et couvrir les tubes avec du parafilm.

### INTERPRETATION :

- 1) Faire une observation visuelle : du dépôt formé (hauteur et tassement des lies). Exprimer la hauteur des lies en pourcentage. Séparer le vin clair des lies en prélevant délicatement le surnageant avec une pipette. **Attention à ne pas remettre les lies en suspension.** Observer l'aspect du surnageant.
- 2) Analyses des vins
  - Estimation de la filtrabilité des surnageants de toutes les modalités

Prélever 60 mL de surnageant de vin sans remuer le fond de la bouteille  
Vider en une seule fois le volume de vin prélevé dans un papier filtre installé sur un entonnoir au dessus d'une éprouvette graduée.

Estimer le temps nécessaire pour filtrer 40 mL en secondes

- Faire les analyses répertoriées ci-dessous sur le filtrat :

Analyses
Indice des polyphénols totaux (DO 280 nm)
A420 nm, 520, 620, IC (somme des 3), nuance (DO420/DO520)
Turbidité
Lab

- 3) Analyse sensorielle des différentes modalités (à l'aveugle dans la pratique).
- 4) Consigner les différents résultats dans un tableau et conclure sur le choix du collage

# ESSAIS DE COLLAGE DES VINS ROSES

## TESTS PREALABLES

- 1) S'assurer que le vin a été sulfité : doser le SO<sub>2</sub> libre et total sur le vin brut (dosage potentiométrique)
- 2) Faire un test de présence de protéines (Bentotest : voir fiche)

## PREPARATION DES COLLES

Dissoudre 4 g de bentonite dans 100 mL d'eau distillée

Laisser gonfler le plus longtemps possible

## OBSERVATION ANALYTIQUE DU VIN

- **Mesurer la turbidité du vin**
- Filtrer 50 mL de vin brut : Mesurer DO420 et DO 520 nm
- Prendre 250 mL de vin brut et ajuster le SO<sub>2</sub> libre à 30 mg/L à l'aide de la solution diluée (1,8 g/L)
- Filtrer 20 mL de vin sulfité et mesurer DO 420 et 520 nm

## MISE EN ŒUVRE DU COLLAGE

Introduire 50 mL de vin rosé non filtré mais sulfité dans 4 tubes à essais :

- Tube 1 : témoin
- Tube 2 : Ajouter 30g/hl de bentonite
- Tube 3: Ajouter 60g/hl de bentonite
- Tube 4 : Ajouter 90g/hl de bentonite

Bien homogénéiser et couvrir les tubes

## INTERPRETATION :

- 1) Faire une observation visuelle : du dépôt formé (hauteur et tassement des lies). Exprimer la hauteur des lies en pourcentage. Observer l'aspect du surnageant. Mesurer la turbidité.
- 2) Analyses des vins  
Mesurer les absorbances à 420 et 520 nm  
Faire les bentotests
- 3) Résultats : Consigner l'ensemble des valeurs trouvées dans un tableau de résultats ; noter vos résultats et le collage recommandé suite aux analyses.

# BENTOTEST

Réactif aux protéines

## RECHERCHE DES PROTEINES DETERMINATION DES DOSES DE TRAITEMENT A LA BENTONITE

Le **BENTOTEST** est un **réactif** qui permet de mettre rapidement en **évidence la présence de protéines dans le vin**.

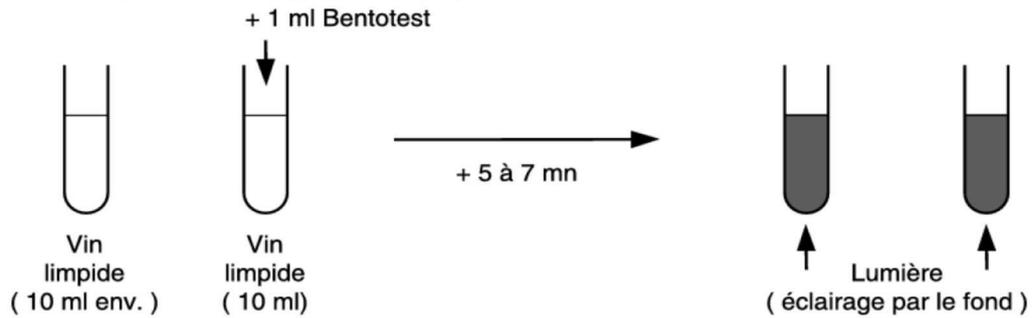
Il peut être utilisé pour déterminer la quantité de bentonite nécessaire et suffisante pour éliminer les protéines d'un vin blanc ou rosé

### MODE OPERATOIRE

- ◆ Prendre 10 mL de vin limpide (filtré si nécessaire) y ajouter 1 mL de **BENTOTEST**. Mélanger. Attendre quelques minutes. Observer la présence d'un trouble comparativement à un témoin limpide sans **BENTOTEST** : le trouble est d'autant plus important que la teneur du vin en protéines est élevée.
- ◆ Le trouble demande 5 à 7 minutes pour se former.  
La présence de fer dans le vin peut donner avec le **BENTOTEST** une coloration bleue intense qui gêne pour l'observation du trouble, on peut la modifier en ajoutant une goutte d'eau oxygénée aux deux tubes, essai et témoin, la couleur bleue disparaît. La lecture du trouble devient possible.
- ◆ L'observation d'un trouble léger peut s'effectuer par éclairage latéral sur fond noir : dans un endroit sombre, éclairer le bas du tube à essai avec une lampe électrique et observer le faisceau lumineux à travers le liquide.  
En opérant de cette façon la méthode de mise en évidence des protéines par le **BENTOTEST** est très sensible.
- ◆ Le trouble formé est également quantifiable à l'aide d'un néphélomètre.
- ◆ De tous les tests existants pour la mise en évidence des protéines dans les vins, **BENTOTEST** est le plus complet.
- ◆ Pour déterminer la dose de bentonite nécessaire à l'élimination des protéines d'un vin blanc ou rosé, il faudra faire en laboratoire des essais de traitement avec différentes doses (10 g/hL – 20 g/hL - 40 g/hL - 60 g/hL - 80 g/hL) de bentonite gonflée et déterminer sur le vin traité et filtré l'échantillon à partir duquel il n'y a plus de trouble avec le **BENTOTEST**.  
Très rapidement l'expérience permet de limiter les essais à 2 ou 3.

## EXEMPLE D'APPLICATION

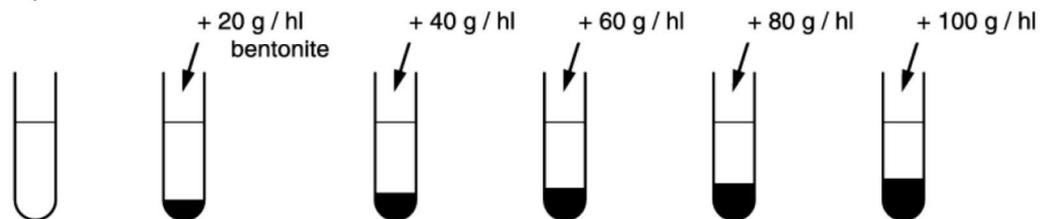
- ◆ Mise en évidence de la présence de protéines dans un vin :



Conclusion : le trouble (plus ou moins intense) apparu traduit la présence (plus ou moins) importante de protéines.

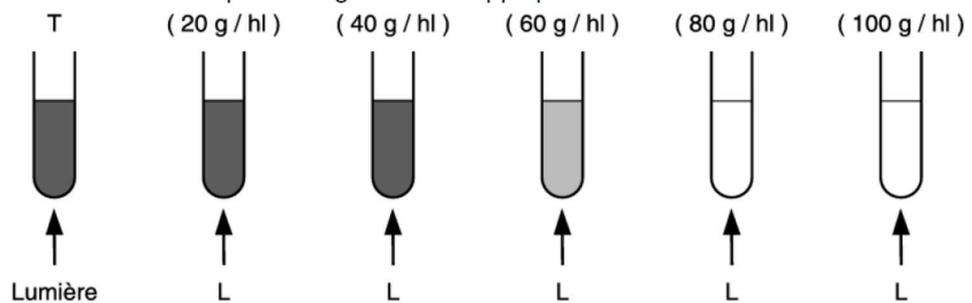
- ◆ Détermination de la dose utile de bentonite :

- Test préalable de traitement à la bentonite:



Vin témoin

- Prélever 10 mL de chaque surnageant et lui appliquer le BENTOTEST :



Le trouble devient moins important pour le traitement 60 g/hL de bentonite, il disparaît à 80 g/hL. La dose adaptée de bentonite se situe entre 60 g/hL et 80 g/hL. En pratique, on retiendra 70 g/hL.

## CONDITIONNEMENT

- ◆ Flacons de 250 mL.

## CONDITIONS DE CONSERVATION

- ◆ Se conserve parfaitement.



## 8.1 Introduction

Les casses ferriques sont des accidents de limpidité dans les vins lorsqu'ils sont soumis à une aération. La manifestation de ces phénomènes est l'apparition de troubles allant jusqu'au précipité blanc dans le cas des vins blancs et au précipité bleu dans des vins rouges. La **casse blanche**, fréquente surtout dans les vins blancs, est un précipité de phosphato-ferrique. Le vin devient opalescent, se trouble et forme un dépôt blanchâtre. La casse ferrique est un phénomène d'oxydation et le trouble n'apparaît qu'après un contact avec l'air après quelques jours.

Il n'y a pas de **limite réglementaire** de la teneur en fer d'un vin, mais il est généralement accepté que la casse blanche pourrait survenir à partir **10 mg/L**. Cependant d'autres facteurs rentrent en jeu, notamment la présence de protéines et la teneur en phosphate apporté par l'addition du DAP. S'il y a un grand excès de fer il faut éliminer cet excès sur les vins blancs grâce au **ferrocyanure de potassium** et au phytate de calcium dans les vins rouges. Le traitement avec le ferrocyanure de potassium est réservé, tout au moins en France aux vins blancs et rosés.

## 8.2 Séance 1

### 8.2.1 Dosage du fer initial

Dans 2 tubes de 10 mL (*votre poste*) ajouter :

<u>Dosage</u>	<u>Témoin</u>	
1 mL vin	1 mL eau	Pipette 2 traits
5 mL HCl 5%	5 mL HCl 5%	Pipette automatique 5 mL
1 mL KSCN 20%	1 mL KSCN 20%	Pipette automatique 1 mL
<b>4 gtts de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>4 gtts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Pipette pasteur ( <i>idem</i> )

- Bien agiter les tubes
- Attendre 5 minutes et mesurer l'absorbance à 480 nm, en faisant le zéro avec le témoin.

**Si l'absorbance dépasse 0,8 AU, appliquer la dilution adéquate afin d'obtenir une valeur d'absorbance comprise entre 0,2 et 0,8 et préparer votre solution dosage de nouveau.**

Calculer la concentration en fer à partir de la courbe d'étalons dont l'équation est :

$$y = 0.0221x - 0.0032$$

### **8.2.2 Préparation de la gamme préparatoire**

Pour déterminer la dose de ferrocyanure à utiliser sans qu'il y ait d'excès, et tout en conservant dans le vin une quantité minimale de fer résiduel, on se base sur (a) la teneur en fer dans 40 mL du vin (b) le fait qu'il faut entre 6mg/L et 9 mg/L de ferrocyanure pour éliminer 1 mg/L de fer.

1. Ajouter 40 mL de vin dans les 4 grands tubes fournis. Calculer 4 volumes d'une solution de ferrocyanure ferrique à 1 % (*centre de paille*) nécessaire afin d'obtenir entre 5 mg/L et 10 mg/L de ferrocyanure pour chaque mg/L de fer dans les 40 mL de vin.
2. Ajouter ces volumes calculés dans les 4 tubes. Bien agiter & **attendre 15 minutes**.
3. Ensuite ajouter **DANS L'ORDRE** :  
1 mL de solution de tanin œnologique 10g/L (**Pipette écoulement libre**) & **agiter**.  
1 mL de gélatine 10 g/L (**Pipette écoulement libre**) & **agiter**.

**LAISSER FLOCULER 24 h**

## **8.3 Séance 2**

### **8.3.1 Test préparatoire**

1. Prélever environ 5 mL de surnageant dans chaque tube et (s'il contient des particules filtrer) dans 4 tubes de 10 mL.
2. Placer 5 mL de vin non-traité au ferrocyanure dans un 5<sup>ème</sup> tube de 10 mL.
3. Ajouter 3 gouttes d'une solution saturée d'alun de fer et 10 gouttes de HCl ½ dans les 5 tubes.
4. Attendre 10 minutes avant de faire l'observation. (*si les solutions commencent à se troubler, ajouter quelques gouttes de HCl ½*).

S'il se produit une coloration bleue suite à l'ajout de la solution d'alun de fer et de HCl ½, il reste un excès de ferrocyanure dans le vin. Si on n'observe pas de coloration bleue, observer de nouveau au bout d'environ 10 minutes dans le sens de la longueur sur un fond blanc et comparativement avec le vin n'ayant pas reçu l'addition de ferrocyanure.

### **8.3.2 Préparation de la gamme définitive**

Préparer une deuxième gamme de 4 concentrations entre celles correspondant au dernier tube sans, et le premier tube avec une coloration bleue.

Ensuite effectuer les **étapes a à c** comme jour 1.

**LAISSER FLOCULER 24 h**

## 8.4 Séance 3 Test définitif et dosage du fer résiduel

### 8.4.1 Test définitif

Effectuer les **étapes 1 à 5** comme pour la séance 2.

La dose retenue sera celle du dernier tube sans excès de ferrocyanure (coloration bleue franche)

Convertir les mL de la solution de ferrocyanure à 1 % pour 40 mL vin mg/L et g/hL de vin.

.....

### 8.4.2 Dosage du fer résiduel

Le *Règlement du 24.7.2009 du Journal officiel de l'Union européenne (L 193/17)* pour les pratiques œnologiques stipule qu'il doit rester du fer dans le vin traité. Il faut doser donc doser le fer résiduel. Pour ce faire, prélever du surnageant dans le grand tube correspondant à la dose choisie.

Doser le fer résiduel par la méthode de dosage employée lors de la première séance.

Si la teneur en fer résiduel est inférieure à 0.5 mg/L environ la dose de ferrocyanure est un peu trop élevée et il convient d'envisager une dose moins importante en chai. Au contrario, si la teneur en fer résiduel dépasse 5 mg/L environ une dose plus importante de ferrocyanure en chai pourrait être envisagée.

***Dans le fichier Excel, sur l'ordinateur, renseigner les informations suivantes :***

- *Prénoms/Noms (du binôme)*
  - *Vin N°*
  - *Concentration en fer initial (mg/L)*
  - *Dose de ferrocyanure choisie en mL de la solution à 1 % pour 40 mL vin et en g/hl*
  - *Concentration finale de fer (mg/L)*
- .....



# **DEUXIEME ANNEE**

## **SECTION 9 PRODUITS DERIVES DE LA VIGNE ET DU VIN**

---

---

### **9.1 Analyse des eaux de vie**

L'analyse des alcools et des eaux-de-vie comprend l'examen organoleptique (couleur, limpidité, dégustation) ainsi que la détermination de la masse volumique (ou de la densité qui peut être exprimée en titre alcoométrique brut), la mesure du titre alcoométrique brut, la mesure du titre alcoométrique (titre alcoométrique réel), de l'extrait sec (matières sèches), de l'acidité de titration (acidité totale) et des constituants volatils autres que l'éthanol.

Le coefficient de non alcool est la somme en grammes par hectolitre d'alcool pur (à 100 % vol.) des constituants suivants :

- acidité volatile exprimée en acide acétique,
- esters exprimés en acétate d'éthyle,
- aldéhydes exprimés en éthanal,
- furfural exprimé en furfural.

#### ***CONDUITE DE L'ANALYSE :***

On détermine d'abord le titre alcoométrique brut directement sur l'eau-de-vie puis, après distillation, on mesure le titre alcoométrique réel.

Le titre alcoométrique du distillat obtenu est ensuite ajusté à 50 % vol.. C'est sur cette solution que l'on effectuera certains dosages : esters, aldéhydes et furfural. Dans le cas où le distillat a été ajusté à 50 % vol. par addition d'alcool, les résultats obtenus, pour ces dosages, devront être multipliés par un facteur correctif dont le calcul est explicité plus loin.

#### **9.1.1 Titres alcoométriques des eaux-de-vie**

Remarque préalable : on réservera le qualificatif "apparent" à toute détermination (masse volumique ou titre alcoométrique) exprimée à une autre température que la température de référence de 20 °C.

## **TITRE ALCOOMÉTRIQUE BRUT**

### *DEFINITION*

Le titre alcoométrique brut des alcools et eaux-de-vie est égal au nombre de litres d'alcool éthylique contenus dans 100 litres de mélange hydroalcoolique ayant même masse volumique que l'alcool ou l'eau-de-vie, ces volumes étant tous deux mesurés à 20 °C. Il est déterminé directement sur l'eau-de-vie.

### *MODE OPERATOIRE*

La méthode de référence fait appel à la pycnométrie. Nous utiliserons la méthode par la balance hydrostatique.

La méthode usuelle fait appel à l'aréométrie. Après avoir rempli l'éprouvette avec de l'eau-de-vie on plonge l'alcoomètre, faire un mouvement de haut en bas et de rotation sur lui-même avant de la laisser libre et attendre quelques minutes avant de faire la lecture en bas du ménisque. On lit ainsi le titre alcoométrique brut apparent. On mesure aussitôt la température du liquide afin de pouvoir déterminer la correction à effectuer pour obtenir le titre alcoométrique brut à la température de référence de 20 °C. Les alcoomètres utilisés sont gradués à 15 °C (ancienne température de référence). La première correction permet d'exprimer à 15 °C le degré alcoolique lu à T °C. Avec une deuxième table de transformation on calculera le titre alcoométrique brut à 20 °C.

## **TITRE ALCOOMÉTRIQUE RÉEL**

### *DEFINITION*

Le titre alcoométrique réel est égal au nombre de litres d'alcool éthylique contenus dans 100 litres d'eau-de-vie. Ces volumes étant tous deux mesurés à la température de 20 °C.

Le titre alcoométrique réel est mesuré sur le distillat.

### *DISTILLATION*

La température de l'eau-de-vie doit être notée avant la distillation.

Avec une fiole jaugée, on prélève 200 ml d'eau-de-vie dont le titre alcoométrique brut est inférieur à 60 % vol., sinon il faut la diluer au 1/2. On les met dans un ballon de 1 litre et on rince la fiole avec environ 4 fois 50 ml d'eau; ces liquides de rinçage sont rajoutés dans le ballon. On recueille un peu moins de 200 ml de distillat dans la même fiole jaugée, le tube barboteur plongeant dans environ 5 ml d'eau.

On ramène à la température qui était celle de l'eau-de-vie de départ à environ 1 °C près et on complète au trait de jauge. On prend alors le titre alcoométrique réel apparent. On effectue les corrections nécessaires pour calculer le titre alcoométrique réel à la température de référence de 20 °C.

TABLE n° 1

Corrections c à apporter au titre alcoométrique volumique français de 1884 à 15 °C ( $A_f$ ) pour obtenir le titre alcoométrique volumique international à 20 °C ( $A_{20}$  °C).

$$A_{20} \text{ °C} = A_f + c.$$

$A_f$	c										
0,0	0,00	5,0	0,08	10,0	0,13	15,0	0,17	20,0	0,25	25,0	0,21
0,1	0,00	5,1	0,08	10,1	0,13	15,1	0,17	20,1	0,25	25,1	0,21
0,2	0,01	5,2	0,08	10,2	0,13	15,2	0,17	20,2	0,25	25,2	0,21
0,3	0,01	5,3	0,08	10,3	0,13	15,3	0,17	20,3	0,25	25,3	0,21
0,4	0,01	5,4	0,08	10,4	0,13	15,4	0,17	20,4	0,25	25,4	0,21
0,5	0,02	5,5	0,09	10,5	0,13	15,5	0,18	20,5	0,25	25,5	0,21
0,6	0,02	5,6	0,09	10,6	0,13	15,6	0,18	20,6	0,25	25,6	0,20
0,7	0,02	5,7	0,09	10,7	0,13	15,7	0,18	20,7	0,25	25,7	0,20
0,8	0,02	5,8	0,09	10,8	0,13	15,8	0,18	20,8	0,25	25,8	0,20
0,9	0,03	5,9	0,09	10,9	0,13	15,9	0,18	20,9	0,25	25,9	0,20
1,0	0,03	6,0	0,09	11,0	0,13	16,0	0,18	21,0	0,25	26,0	0,20
1,1	0,03	6,1	0,09	11,1	0,13	16,1	0,18	21,1	0,25	26,1	0,20
1,2	0,04	6,2	0,09	11,2	0,13	16,2	0,18	21,2	0,25	26,2	0,20
1,3	0,04	6,3	0,09	11,3	0,13	16,3	0,19	21,3	0,25	26,3	0,19
1,4	0,04	6,4	0,09	11,4	0,13	16,4	0,19	21,4	0,25	26,4	0,19
1,5	0,05	6,5	0,10	11,5	0,14	16,5	0,19	21,5	0,25	26,5	0,19
1,6	0,05	6,6	0,10	11,6	0,14	16,6	0,19	21,6	0,25	26,6	0,19
1,7	0,05	6,7	0,10	11,7	0,14	16,7	0,19	21,7	0,25	26,7	0,19
1,8	0,05	6,8	0,10	11,8	0,14	16,8	0,20	21,8	0,25	26,8	0,18
1,9	0,06	6,9	0,10	11,9	0,14	16,9	0,20	21,9	0,25	26,9	0,18
2,0	0,06	7,0	0,10	12,0	0,14	17,0	0,20	22,0	0,25	27,0	0,18
2,1	0,06	7,1	0,10	12,1	0,14	17,1	0,20	22,1	0,25	27,1	0,18
2,2	0,06	7,2	0,10	12,2	0,14	17,2	0,20	22,2	0,25	27,2	0,18
2,3	0,06	7,3	0,10	12,3	0,14	17,3	0,20	22,3	0,25	27,3	0,17
2,4	0,06	7,4	0,10	12,4	0,14	17,4	0,20	22,4	0,25	27,4	0,17
2,5	0,06	7,5	0,11	12,5	0,15	17,5	0,21	22,5	0,25	27,5	0,17
2,6	0,06	7,6	0,11	12,6	0,15	17,6	0,21	22,6	0,25	27,6	0,17
2,7	0,06	7,7	0,11	12,7	0,15	17,7	0,21	22,7	0,25	27,7	0,17
2,8	0,06	7,8	0,11	12,8	0,15	17,8	0,21	22,8	0,25	27,8	0,16
2,9	0,06	7,9	0,11	12,9	0,15	17,9	0,21	22,9	0,25	27,9	0,16
3,0	0,06	8,0	0,11	13,0	0,15	18,0	0,21	23,0	0,25	28,0	0,16
3,1	0,06	8,1	0,11	13,1	0,15	18,1	0,21	23,1	0,25	28,1	0,16
3,2	0,06	8,2	0,11	13,2	0,15	18,2	0,21	23,2	0,25	28,2	0,16
3,3	0,06	8,3	0,11	13,3	0,15	18,3	0,22	23,3	0,25	28,3	0,15
3,4	0,06	8,4	0,11	13,4	0,15	18,4	0,22	23,4	0,25	28,4	0,15
3,5	0,06	8,5	0,12	13,5	0,16	18,5	0,22	23,5	0,25	28,5	0,15
3,6	0,06	8,6	0,12	13,6	0,16	18,6	0,22	23,6	0,24	28,6	0,15
3,7	0,06	8,7	0,12	13,7	0,16	18,7	0,22	23,7	0,24	28,7	0,15
3,8	0,06	8,8	0,12	13,8	0,16	18,8	0,23	23,8	0,24	28,8	0,14
3,9	0,06	8,9	0,12	13,9	0,16	18,9	0,23	23,9	0,24	28,9	0,14
4,0	0,06	9,0	0,12	14,0	0,16	19,0	0,23	24,0	0,24	29,0	0,14
4,1	0,06	9,1	0,12	14,1	0,16	19,1	0,23	24,1	0,23	29,1	0,14
4,2	0,06	9,2	0,12	14,2	0,16	19,2	0,23	24,2	0,23	29,2	0,14
4,3	0,07	9,3	0,12	14,3	0,16	19,3	0,24	24,3	0,23	29,3	0,14
4,4	0,07	9,4	0,12	14,4	0,16	19,4	0,24	24,4	0,23	29,4	0,14
4,5	0,07	9,5	0,13	14,5	0,17	19,5	0,24	24,5	0,23	29,5	0,14
4,6	0,07	9,6	0,13	14,6	0,17	19,6	0,24	24,6	0,22	29,6	0,14
4,7	0,07	9,7	0,13	14,7	0,17	19,7	0,24	24,7	0,22	29,7	0,14
4,8	0,08	9,8	0,13	14,8	0,17	19,8	0,25	24,8	0,22	29,8	0,14
4,9	0,08	9,9	0,13	14,9	0,17	19,9	0,25	24,9	0,21	29,9	0,14

$\lambda_f$	c								
30,0	0,14	35,0	0,11	40,0	0,14	45,0	0,18	50,0	0,18
30,1	0,14	35,1	0,11	40,1	0,14	45,1	0,18	50,1	0,18
30,2	0,14	35,2	0,11	40,2	0,14	45,2	0,18	50,2	0,18
30,3	0,14	35,3	0,11	40,3	0,15	45,3	0,18	50,3	0,18
30,4	0,14	35,4	0,11	40,4	0,15	45,4	0,18	50,4	0,18
30,5	0,14	35,5	0,12	40,5	0,15	45,5	0,18	50,5	0,18
30,6	0,13	35,6	0,12	40,6	0,15	45,6	0,18	50,6	0,18
30,7	0,13	35,7	0,12	40,7	0,15	45,7	0,18	50,7	0,18
30,8	0,13	35,8	0,12	40,8	0,16	45,8	0,18	50,8	0,18
30,9	0,13	35,9	0,12	40,9	0,16	45,9	0,18	50,9	0,18
31,0	0,13	36,0	0,12	41,0	0,16	46,0	0,18	51,0	0,18
31,1	0,13	36,1	0,12	41,1	0,16	46,1	0,18	51,1	0,18
31,2	0,13	36,2	0,12	41,2	0,16	46,2	0,18	51,2	0,18
31,3	0,13	36,3	0,12	41,3	0,17	46,3	0,18	51,3	0,18
31,4	0,13	36,4	0,12	41,4	0,17	46,4	0,18	51,4	0,18
31,5	0,13	36,5	0,13	41,5	0,17	46,5	0,18	51,5	0,18
31,6	0,13	36,6	0,13	41,6	0,17	46,6	0,18	51,6	0,18
31,7	0,13	36,7	0,13	41,7	0,17	46,7	0,18	51,7	0,18
31,8	0,13	36,8	0,13	41,8	0,18	46,8	0,18	51,8	0,18
31,9	0,13	36,9	0,13	41,9	0,18	46,9	0,18	51,9	0,18
32,0	0,13	37,0	0,13	42,0	0,18	47,0	0,18	52,0	0,18
32,1	0,13	37,1	0,13	42,1	0,18	47,1	0,18	52,1	0,18
32,2	0,13	37,2	0,13	42,2	0,18	47,2	0,18	52,2	0,18
32,3	0,13	37,3	0,13	42,3	0,18	47,3	0,18	52,3	0,18
32,4	0,13	37,4	0,13	42,4	0,18	47,4	0,18	52,4	0,18
32,5	0,13	37,5	0,13	42,5	0,18	47,5	0,18	52,5	0,18
32,6	0,12	37,6	0,13	42,6	0,18	47,6	0,18	52,6	0,18
32,7	0,12	37,7	0,13	42,7	0,18	47,7	0,18	52,7	0,19
32,8	0,12	37,8	0,13	42,8	0,18	47,8	0,18	52,8	0,19
32,9	0,12	37,9	0,13	42,9	0,18	47,9	0,18	52,9	0,19
33,0	0,12	38,0	0,13	43,0	0,18	48,0	0,18	53,0	0,19
33,1	0,12	38,1	0,13	43,1	0,18	48,1	0,18	53,1	0,19
33,2	0,12	38,2	0,13	43,2	0,18	48,2	0,18	53,2	0,19
33,3	0,12	38,3	0,13	43,3	0,18	48,3	0,18	53,3	0,19
33,4	0,12	38,4	0,13	43,4	0,18	48,4	0,18	53,4	0,19
33,5	0,12	38,5	0,13	43,5	0,18	48,5	0,18	53,5	0,20
33,6	0,12	38,6	0,13	43,6	0,18	48,6	0,18	53,6	0,20
33,7	0,12	38,7	0,13	43,7	0,18	48,7	0,18	53,7	0,20
33,8	0,12	38,8	0,13	43,8	0,18	48,8	0,18	53,8	0,20
33,9	0,12	38,9	0,13	43,9	0,18	48,9	0,18	53,9	0,20
34,0	0,12	39,0	0,13	44,0	0,18	49,0	0,18	54,0	0,20
34,1	0,12	39,1	0,13	44,1	0,18	49,1	0,18	54,1	0,20
34,2	0,12	39,2	0,13	44,2	0,18	49,2	0,18	54,2	0,20
34,3	0,12	39,3	0,13	44,3	0,18	49,3	0,18	54,3	0,21
34,4	0,12	39,4	0,13	44,4	0,18	49,4	0,18	54,4	0,21
34,5	0,12	39,5	0,13	44,5	0,18	49,5	0,18	54,5	0,21
34,6	0,11	39,6	0,13	44,6	0,18	49,6	0,18	54,6	0,21
34,7	0,11	39,7	0,13	44,7	0,18	49,7	0,18	54,7	0,21
34,8	0,11	39,8	0,13	44,8	0,18	49,8	0,18	54,8	0,22
34,9	0,11	39,9	0,13	44,9	0,18	49,9	0,18	54,9	0,22

$\lambda_r$	$\alpha$								
55,0	0,22	60,0	0,10	65,0	0,12	70,0	0,08	75,0	0,05
55,1	0,22	60,1	0,10	65,1	0,12	70,1	0,08	75,1	0,05
55,2	0,22	60,2	0,18	65,2	0,11	70,2	0,08	75,2	0,05
55,3	0,22	60,3	0,18	65,3	0,11	70,3	0,08	75,3	0,05
55,4	0,22	60,4	0,18	65,4	0,11	70,4	0,08	75,4	0,05
55,5	0,23	60,5	0,18	65,5	0,11	70,5	0,08	75,5	0,05
55,6	0,23	60,6	0,18	65,6	0,11	70,6	0,08	75,6	0,05
55,7	0,23	60,7	0,17	65,7	0,11	70,7	0,08	75,7	0,05
55,8	0,23	60,8	0,17	65,8	0,11	70,8	0,08	75,8	0,05
55,9	0,23	60,9	0,17	65,9	0,11	70,9	0,08	75,9	0,05
56,0	0,23	61,0	0,17	66,0	0,11	71,0	0,07	76,0	0,05
56,1	0,23	61,1	0,17	66,1	0,10	71,1	0,07	76,1	0,05
56,2	0,23	61,2	0,17	66,2	0,10	71,2	0,07	76,2	0,05
56,3	0,23	61,3	0,16	66,3	0,10	71,3	0,07	76,3	0,05
56,4	0,23	61,4	0,16	66,4	0,10	71,4	0,07	76,4	0,05
56,5	0,23	61,5	0,16	66,5	0,10	71,5	0,07	76,5	0,05
56,6	0,23	61,6	0,16	66,6	0,10	71,6	0,07	76,6	0,05
56,7	0,23	61,7	0,16	66,7	0,10	71,7	0,07	76,7	0,05
56,8	0,23	61,8	0,16	66,8	0,10	71,8	0,07	76,8	0,05
56,9	0,23	61,9	0,15	66,9	0,10	71,9	0,07	76,9	0,05
57,0	0,22	62,0	0,15	67,0	0,10	72,0	0,07	77,0	0,05
57,1	0,22	62,1	0,15	67,1	0,09	72,1	0,07	77,1	0,05
57,2	0,22	62,2	0,15	67,2	0,09	72,2	0,07	77,2	0,05
57,3	0,22	62,3	0,15	67,3	0,09	72,3	0,07	77,3	0,05
57,4	0,22	62,4	0,15	67,4	0,09	72,4	0,07	77,4	0,05
57,5	0,22	62,5	0,14	67,5	0,09	72,5	0,07	77,5	0,05
57,6	0,21	62,6	0,14	67,6	0,09	72,6	0,06	77,6	0,05
57,7	0,21	62,7	0,14	67,7	0,09	72,7	0,06	77,7	0,05
57,8	0,21	62,8	0,14	67,8	0,09	72,8	0,06	77,8	0,05
57,9	0,21	62,9	0,14	67,9	0,09	72,9	0,06	77,9	0,05
58,0	0,21	63,0	0,14	68,0	0,09	73,0	0,06	78,0	0,05
58,1	0,21	63,1	0,13	68,1	0,09	73,1	0,06	78,1	0,05
58,2	0,21	63,2	0,13	68,2	0,09	73,2	0,06	78,2	0,05
58,3	0,20	63,3	0,13	68,3	0,09	73,3	0,06	78,3	0,05
58,4	0,20	63,4	0,13	68,4	0,09	73,4	0,06	78,4	0,05
58,5	0,20	63,5	0,13	68,5	0,09	73,5	0,06	78,5	0,05
58,6	0,20	63,6	0,13	68,6	0,09	73,6	0,06	78,6	0,05
58,7	0,20	63,7	0,13	68,7	0,09	73,7	0,06	78,7	0,05
58,8	0,19	63,8	0,13	68,8	0,09	73,8	0,06	78,8	0,05
58,9	0,19	63,9	0,13	68,9	0,09	73,9	0,06	78,9	0,05
59,0	0,19	64,0	0,13	69,0	0,09	74,0	0,06	79,0	0,05
59,1	0,19	64,1	0,12	69,1	0,08	74,1	0,06	79,1	0,05
59,2	0,19	64,2	0,12	69,2	0,08	74,2	0,06	79,2	0,05
59,3	0,19	64,3	0,12	69,3	0,08	74,3	0,06	79,3	0,05
59,4	0,19	64,4	0,12	69,4	0,08	74,4	0,06	79,4	0,04
59,5	0,19	64,5	0,12	69,5	0,08	74,5	0,06	79,5	0,04
59,6	0,18	64,6	0,12	69,6	0,08	74,6	0,05	79,6	0,04
59,7	0,18	64,7	0,12	69,7	0,08	74,7	0,05	79,7	0,04
59,8	0,18	64,8	0,12	69,8	0,08	74,8	0,05	79,8	0,04
59,9	0,18	64,9	0,12	69,9	0,08	74,9	0,05	79,9	0,04

$\lambda_r$	c	$\lambda_r$	c	$\lambda_r$	c	$\lambda_r$	a
80,0	0,04	85,0	0,04	90,0	0,02	95,0	0
80,1	0,04	85,1	0,04	90,1	0,02	95,1	0
80,2	0,04	85,2	0,04	90,2	0,02	95,2	0
80,3	0,04	85,3	0,04	90,3	0,02	95,3	0
80,4	0,04	85,4	0,04	90,4	0,02	95,4	0
80,5	0,04	85,5	0,04	90,5	0,02	95,5	0
80,6	0,04	85,6	0,04	90,6	0,02	95,6	0
80,7	0,04	85,7	0,04	90,7	0,02	95,7	0
80,8	0,04	85,8	0,04	90,8	0,02	95,8	0
80,9	0,04	85,9	0,04	90,9	0,02	95,9	0
81,0	0,04	86,0	0,04	91,0	0,02	96,0	0
81,1	0,04	86,1	0,04	91,1	0,02	96,1	0
81,2	0,04	86,2	0,04	91,2	0,02	96,2	0
81,3	0,04	86,3	0,04	91,3	0,02	96,3	0
81,4	0,04	86,4	0,04	91,4	0,02	96,4	0
81,5	0,04	86,5	0,04	91,5	0,02	96,5	0
81,6	0,04	86,6	0,04	91,6	0,02	96,6	0
81,7	0,04	86,7	0,04	91,7	0,02	96,7	0
81,8	0,04	86,8	0,04	91,8	0,02	96,8	0
81,9	0,04	86,9	0,04	91,9	0,02	96,9	0
82,0	0,04	87,0	0,04	92,0	0,02	97,0	0
82,1	0,04	87,1	0,04	92,1	0,02	97,1	0
82,2	0,04	87,2	0,04	92,2	0,02	97,2	0
82,3	0,04	87,3	0,04	92,3	0,02	97,3	0
82,4	0,04	87,4	0,04	92,4	0,02	97,4	0
82,5	0,04	87,5	0,04	92,5	0,02	97,5	0
82,6	0,04	87,6	0,03	92,6	0,01	97,6	0
82,7	0,04	87,7	0,03	92,7	0,01	97,7	0
82,8	0,04	87,8	0,03	92,8	0,01	97,8	0
82,9	0,04	87,9	0,03	92,9	0,01	97,9	0
83,0	0,04	88,0	0,03	93,0	0,01	98,0	0
83,1	0,04	88,1	0,03	93,1	0,01	98,1	0
83,2	0,04	88,2	0,03	93,2	0,01	98,2	0
83,3	0,04	88,3	0,03	93,3	0,01	98,3	0
83,4	0,04	88,4	0,03	93,4	0,01	98,4	0
83,5	0,04	88,5	0,03	93,5	0,01	98,5	0
83,6	0,04	88,6	0,03	93,6	0,01	98,6	0
83,7	0,04	88,7	0,03	93,7	0,01	98,7	0
83,8	0,04	88,8	0,03	93,8	0,01	98,8	0
83,9	0,04	88,9	0,03	93,9	0,01	98,9	0
84,0	0,04	89,0	0,03	94,0	0,01	99,0	- 0,01
84,1	0,04	89,1	0,03	94,1	0,01	99,1	- 0,01
84,2	0,04	89,2	0,03	94,2	0,01	99,2	- 0,01
84,3	0,04	89,3	0,03	94,3	0,01	99,3	- 0,01
84,4	0,04	89,4	0,03	94,4	0,01	99,4	- 0,01
84,5	0,04	89,5	0,03	94,5	0,01	99,5	- 0,02
84,6	0,04	89,6	0,02	94,6	0	99,6	- 0,02
84,7	0,04	89,7	0,02	94,7	0	99,7	- 0,02
84,8	0,04	89,8	0,02	94,8	0	99,8	- 0,02
84,9	0,04	89,9	0,02	94,9	0	99,9	- 0,02
						100,0	- 0,02

TABLE n°2 : Force réelle par degrés entiers

DEGRES du thermo- mètre	DEGRES MARQUES PAR L'ALCOOMETRE									
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
0.....	46.9 1011.	47.9 1011	48.8 1011	49.8 1011	50.7 1011	51.7 1011	52.6 1012	53.5 1012	54.5 1012	55.4 1012
1.....	46.5 1010	47.5 1010	48.4 1010	49.4 1010	50.3 1010	51.3 1011	52.2 1011	53.2 1011	54.2 1011	55.1 1011
2.....	46.1 1009	47.1 1009	48.1 1009	49.0 1009	49.9 1010	50.9 1010	51.8 1010	52.8 1010	52.8 1010	54.7 1010
3.....	45.8 1008	46.7 1009	47.7 1009	48.6 1009	49.6 1009	50.5 1009	51.5 1009	52.4 1009	53.4 1009	54.3 1009
4.....	45.4 1008	46.4 1008	47.4 1008	48.3 1008	49.2 1008	50.2 1008	51.1 1008	52.1 1008	53.0 1008	54.0 1009
5.....	45.0 1007	45.9 1007	46.9 1007	47.9 1007	48.8 1007	49.8 1007	50.7 1007	51.7 1008	52.7 1008	53.6 1008
6.....	44.6 1006	45.5 1006	46.5 1006	47.5 1007	48.4 1007	49.4 1007	50.4 1007	51.4 1007	52.4 1007	53.3 1007
7.....	44.2 1005	45.1 1006	46.1 1006	47.1 1006	48.1 1006	49.1 1006	50.1 1006	51.0 1006	52.0 1006	52.9 1006
8.....	43.8 1005	44.8 1005	45.8 1005	46.8 1005	47.7 1005	48.7 1005	49.7 1005	50.6 1005	51.6 1005	52.6 1005
9.....	43.4 1004	44.4 1004	45.4 1004	46.4 1004	47.3 1004	48.3 1004	49.3 1005	50.2 1005	51.2 1005	52.2 1005
10.....	43.0 1003	44.0 1004	45.0 1004	46.0 1004	46.9 1004	47.9 1004	48.9 1004	49.9 1004	50.9 1004	51.8 1004
11.....	42.6 1003	43.6 1003	44.6 1003	45.6 1003	46.6 1003	47.6 1003	48.6 1003	49.5 1003	50.5 1003	51.5 1003
12.....	42.2 1002	43.2 1002	44.2 1002	45.2 1002	46.2 1002	47.2 1002	48.2 1002	49.2 1002	50.2 1002	51.1 1002
13.....	41.8 1001	42.8 1001	43.8 1001	44.8 1002	45.8 1002	46.8 1002	47.8 1002	48.8 1002	49.8 1002	50.8 1002
14.....	41.4 1001	42.4 1001	43.4 1001	44.4 1001	45.4 1001	46.4 1001	47.4 1001	48.4 1001	49.4 1001	50.4 1001
15.....	41.0 1000	42.0 1000	43.0 1000	44.0 1000	45.0 1000	46.0 1000	47.0 1000	48.0 1000	49.0 1000	50.0 1000
16.....	40.6 999	41.6 999	42.6 999	43.6 999	44.6 999	45.6 999	46.6 999	47.6 999	48.6 999	49.6 999
17.....	40.2 999	41.2 999	42.2 999	43.2 998	44.2 998	45.2 998	46.2 998	47.2 998	48.3 998	49.3 998
18.....	39.8 998	40.8 998	41.8 998	42.8 998	43.8 998	44.9 998	45.9 998	46.9 998	47.9 998	48.9 998
19.....	39.4 997	40.4 997	41.4 997	42.5 997	43.5 997	44.5 997	45.5 997	46.5 997	47.5 997	48.5 997
20.....	39.0 997	40.0 997	41.0 997	42.1 997	43.1 996	44.1 996	45.1 996	46.1 997	47.2 996	48.2 996
21.....	38.6 996	39.6 996	40.6 996	41.7 996	42.7 996	43.7 996	44.8 996	45.8 996	46.8 995	47.8 996

DEGRES du thermo- mètre	DEGRES MARQUES PAR L'ALCOOMETRE									
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
22.....	38.2 990	39.2 995	40.2 995	41.3 995	42.3 995	43.3 995	44.3 995	45.3 995	46.4 995	47.4 995
23.....	37.8 995	38.8 995	39.8 995	40.9 994	41.9 994	42.9 994	43.9 994	44.9 994	46.0 994	47.0 994
24.....	37.4 994	38.4 994	39.4 994	40.5 994	41.5 994	42.5 994	43.6 994	44.6 994	45.6 993	46.6 993
25.....	37.0 994	38.0 994	39.0 993	40.1 993	41.1 993	42.2 993	43.2 993	44.2 993	45.2 993	46.3 993
26.....	36.5 993	37.6 993	38.6 993	39.7 993	40.7 992	41.8 992	42.8 992	43.8 992	44.9 992	45.9 992
27.....	36.1 992	37.2 992	38.2 992	39.3 992	40.3 992	41.4 992	42.4 992	43.4 991	44.5 991	45.5 991
28.....	35.7 992	36.8 992	37.8 992	38.9 991	39.9 991	41.0 991	42.0 991	43.0 991	44.1 991	45.1 990
29.....	35.3 991	36.3 991	37.4 991	38.5 991	39.5 991	40.6 990	41.6 990	42.6 990	43.7 990	44.7 990
30.....	34.9 991	35.9 991	37.0 990	38.1 990	39.1 990	40.2 990	41.2 990	42.3 989	43.3 989	44.3 989
31.....	34.6 990	35.7 990	36.7 989	37.8 989	38.8 989	39.8 989	40.9 989	41.9 988	43.0 988	44.0 988
32.....	34.2 989	35.3 989	36.3 989	37.4 989	38.4 988	39.4 988	40.5 988	41.5 988	42.6 988	43.6 987
33.....	33.8 989	34.9 989	35.9 988	37.0 988	38.0 988	39.0 987	40.1 987	41.1 987	42.2 987	43.2 987
34.....	33.4 988	34.5 988	35.5 988	36.6 987	37.6 987	38.6 987	39.7 987	40.7 986	41.8 986	42.8 986
35.....	33.0 988	34.1 987	35.1 987	36.2 987	37.2 986	38.3 986	39.3 986	40.4 986	41.4 985	42.5 985
36.....	32.6 987	33.7 987	34.7 986	35.7 986	36.8 986	37.9 986	38.9 985	40.0 985	41.0 985	42.1 984
37.....	32.2 987	33.3 986	34.3 986	35.3 985	36.4 985	37.5 985	38.5 985	39.6 984	40.6 984	41.7 984
38.....	31.8 986	32.9 986	33.9 985	34.9 985	36.0 985	37.0 984	38.1 984	39.2 984	40.2 983	41.3 983
39.....	31.4 985	32.5 985	33.5 985	34.5 984	35.6 984	36.6 984	37.7 983	38.8 983	39.8 983	40.9 982
40.....	31.0 985	32.0 985	33.1 984	34.1 984	35.2 984	36.2 983	37.3 983	38.4 982	39.4 982	40.5 982

DEGRES du thermo- mètre	DEGRES MARQUES PAR L'ALCOOMETRE									
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
0.....	56.4 1012	57.3 1012	58.3 1012	59.2 1012	60.2 1012	61.2 1012	62.1 1012	63.1 1013	64.1 1013	65.0 1013
1.....	56.0 1011	57.0 1011	57.9 1011	58.9 1011	59.9 1011	60.9 1011	61.8 1011	62.8 1012	63.8 1012	64.7 1012
2.....	55.7 1010	56.6 1010	57.6 1010	58.5 1010	59.5 1010	60.5 1011	61.5 1011	62.4 1011	63.4 1011	64.4 1011
3.....	55.3 1009	56.3 1009	57.2 1009	58.2 1010	59.2 1010	60.2 1010	61.1 1010	62.1 1010	63.1 1010	64.1 1010
4.....	55.0 1009	56.0 1009	56.9 1009	57.9 1009	58.9 1009	59.8 1009	60.8 1009	61.7 1009	62.7 1009	63.7 1009
5.....	54.6 1008	55.6 1008	56.6 1008	57.5 1008	58.5 1008	59.5 1008	60.4 1008	61.4 1008	62.4 1008	63.4 1008
6.....	54.3 1007	55.2 1007	56.2 1007	57.1 1007	58.1 1007	59.1 1007	60.1 1007	61.0 1008	62.0 1008	63.0 1008
7.....	53.9 1006	54.9 1006	55.9 1006	56.8 1006	57.8 1006	58.8 1006	59.8 1007	60.7 1007	61.7 1007	62.7 1007
8.....	53.6 1005	54.6 1005	55.5 1006	56.5 1006	57.5 1006	58.5 1006	59.5 1006	60.4 1006	61.4 1006	62.4 1006
9.....	53.2 1005	54.2 1005	55.1 1005	56.1 1005	57.1 1005	58.1 1005	59.1 1005	60.0 1005	61.0 1005	62.0 1005
10.....	52.8 1004	53.8 1004	54.8 1004	55.8 1004	56.8 1004	57.8 1004	58.8 1004	59.7 1004	60.7 1004	61.7 1004
11.....	52.5 1003	53.5 1003	54.4 1003	55.4 1003	56.4 1003	57.4 1003	58.4 1003	59.4 1003	60.4 1003	61.4 1003
12.....	52.1 1002	53.1 1002	54.1 1002	55.0 1002	56.0 1002	57.0 1002	58.0 1002	59.0 1002	60.0 1002	61.0 1002
13.....	51.8 1002	52.7 1002	53.7 1002	54.7 1002	55.7 1002	56.7 1002	57.7 1002	58.7 1002	59.7 1002	60.7 1002
14.....	51.4 1001	52.3 1001	53.3 1001	54.3 1001	55.3 1001	56.3 1001	57.3 1001	58.3 1001	59.3 1001	60.3 1001
15.....	51.0 1000	52.0 1000	53.0 1000	54.0 1000	55.0 1000	56.0 1000	57.0 1000	58.0 1000	59.0 1000	60.0 1000
16.....	50.6 999	51.6 999	52.6 999	53.6 999	54.6 999	55.6 999	56.6 999	57.6 999	58.6 999	59.6 999
17.....	50.3 998	51.3 998	52.3 998	53.3 998	54.3 998	55.3 998	56.3 998	57.3 998	58.3 998	59.3 998
18.....	49.9 998	50.9 998	51.9 998	52.9 998	53.9 998	54.9 998	55.9 998	56.9 997	57.9 997	58.9 997
19.....	49.5 997	50.6 997	51.6 997	52.6 997	53.6 997	54.6 997	55.6 997	56.6 997	57.6 997	58.6 997
20.....	49.2 996	50.2 996	51.2 996	52.2 996	53.2 996	54.2 996	55.2 996	56.2 996	57.2 996	58.2 996
21.....	48.8 995	49.8 995	50.8 995	51.8 995	52.9 995	53.9 995	54.9 995	55.9 995	56.9 995	57.9 995

### **9.1.2 Ajustement du distillat a 50 % vol.**

#### *CALCUL DU FACTEUR CORRECTIF*

Le dosage de certains constituants volatils autres que l'éthanol (aldéhydes) doit être fait sur un distillat ramené au titre alcoométrique de 50 % vol.

#### *PREPARATION DU DISTILLAT A 50 % VOL*

Pour préparer le distillat titrant 50 % volume, on se sert du distillat ayant servi à déterminer le titre alcoométrique réel, D.

⇒ D supérieur à 50 % vol., on dilue avec de l'eau.

La table 3 indique le volume d'eau, pris à 20 °C, qu'il faut ajouter à 100 ml de distillat mesurés à 20 °C de titre donné pour ramener son titre à 50 % vol.

⇒ D inférieur à 50 % vol., on ajoute de l'alcool chimiquement pur à 95 % vol. en quantité déterminée.

La table 3 indique le volume à 20 °C d'alcool pur à 95 % vol. qu'il faut ajouter à 100 ml de distillat, pris à 20 °C, pour ramener son titre à 50 % vol.. Dans ce cas, il faudra multiplier les résultats obtenus pour les déterminations effectuées sur ce distillat titrant 50 % vol. par le rapport  $V/2D$ , V étant le volume final à 20 °C du distillat titrant 50 % vol. que l'on obtient après addition d'alcool à 95 % vol. au distillat de titre alcoométrique réel D.

#### ***POUR LES DIFFERENTS DOSAGES (esters, aldéhydes et furfural), ON AURA BESOIN D'AU MOINS 160 ml DE DISTILLAT RAMENE A 50 % vol.***

#### *CALCUL DU FACTEUR CORRECTIF*

On veut exprimer les résultats en g de la substance dosée par hectolitres d'alcool pur, or les dosages sont effectués sur le distillat ajusté à 50 % vol.

Lorsque le distillat est ajusté par diffusion avec de l'eau, tout l'alcool de la solution à 50 % vol. proviennent de l'eau-de-vie : donc il n'y a pas de corrections à apporter.

Il n'en est pas de même si le distillat avait le titre inférieur à 50 % vol. Dans ce cas, le distillat ajusté contient de l'alcool provenant de l'eau-de-vie et de l'alcool rajouté. Il faut donc effectuer une correction afin d'exprimer les résultats en g de substance par hectolitres d'alcool pur provenant de l'eau-de-vie.

Soit V ml le volume obtenu en ajoutant de l'alcool à 100 ml de distillat de titre réel D. Dans V ml de distillat à 50 % vol., il y a  $V/2$  ml d'alcool pur dont D ml qui provienne de l'eau-de-vie.

Soit x g/hl d'alcool pur, la concentration de la substance dosée.

Dans  $V/2$  d'alcool pur, c'est-à-dire dans D hl d'alcool pur provenant de l'eau-de-vie il y a  $V/2 \times x$  g de substance.

Dans 1 hl d'alcool pur provenant de l'eau-de-vie, il y a donc  $x \times (V/2D)$  g de substance.

Le facteur correctif est donc  $V/2D$ .

TABLE n°3

Volumes d'eau à ajouter à 100 volumes d'alcool de titre alcoométrique supérieur à 50 p. 100 pour obtenir un mélange final à 50 p. 100.

TITRE alcoométrique.	VOLUME d'eau distillée à ajouter.	TITRE alcoométrique.	VOLUME d'eau distillée à ajouter.	TITRE alcoométrique.	VOLUME d'eau distillée à ajouter.
100	107,3	83	69,4	66	33,4
99	104,0	82	67,3	65	31,3
98	102,6	81	65,1	64	29,1
97	100,3	80	63	63	27,1
96	98	79	60,9	62	24,9
95	95,7	78	58,7	61	22,9
94	93,5	77	56,6	60	20,8
93	91,5	76	54,4	59	18,7
92	89	75	52,3	58	16,6
91	86,8	74	50,3	57	14,5
90	84,6	73	48,2	56	12,4
89	82,5	72	46	55	10,3
88	80,3	71	43,9	54	8,3
87	78,1	70	41,8	53	6,2
86	75,9	69	39,7	52	4,1
85	73,7	68	37,6	51	2,1
84	71,6	67	35,5	50	0

NOTA. — Ce tableau peut être utilisé toutes les fois que l'on veut analyser un alcool de haut titre, exempt de matières extractives, tel que, alcool rectifié, alcool absolu, eau-de-vie sortant d'une colonne rectificatrice.

Les distillats étant de titre toujours inférieur à 60 p. 100 par leur mode d'obtention, seule la partie comprise entre 50 et 60 p. 100 les concerne.

(\*) Ethanol à 95 p. 100 exempt d'aldéhydes, esters, méthanol, alcools supérieurs.

Volumes d'alcool à 95 p. 100 à ajouter à 100 volumes d'alcool de titre alcoométrique inférieur à 50 p. 100 pour obtenir de l'alcool à 50 p. 100.

TITRE alcoométrique.	VOLUME d'alcool à 95 p. 100 à ajouter.	VOLUME final obtenu.	TITRE alcoométrique.	VOLUME d'alcool à 95 p. 100 à ajouter.	VOLUME final obtenu.
30	42,3	140,3	40	21,3	120,5
31	40,2	138,4	41	19,2	118,5
32	38,1	136,4	42	17,1	116,5
33	36	134,5	43	15	114,5
34	34	132,5	44	12,9	112,4
35	31,9	130,5	45	10,7	110,4
36	29,8	128,5	46	8,6	108,3
37	27,7	126,6	47	6,4	106,2
38	25,6	124,6	48	4,3	104,2
39	23,5	122,6	49	2,2	102,1

Les acidités sont exprimées en g d'acide acétique / hl d'alcool à 100 % vol.

### 9.1.3 Dosage de l'acidité et de l'extrait sec

#### ACIDITÉ TOTALE

##### MODE OPERATOIRE

On dose par NaOH N/10 en présence de 4 ou 5 gouttes de phénolphtaléine, directement sur une prise d'essai de 25 ml de spiritueux dans un erlen de 300 ml, après avoir doublé approximativement le volume avec de l'eau. Soit n ml de NaOH N/10 versés.

$$\text{Acidité totale : } \frac{2400 \times n}{D_r} \text{ en g acide acétique / hl d'alcool à 100 \% vol.}$$

avec  $D_r$  = titre alcoométrique réel du spiritueux distillé

##### REMARQUE

Si l'eau-de-vie est trop colorée (caramel) on titre avec le pH mètre en arrêtant l'affusion de NaOH N/10 à pH 8.

##### ORDRE DE GRANDEUR

10 à 200 g / hl d'alcool à 100 % vol. (moyenne 82) pour les eaux-de-vie de marc.

10 à 150 g / hl d'alcool à 100 % vol. (moyenne 77) pour le Cognac et pour les eaux-de-vie de vin.

#### ACIDITÉ FIXE ET EXTRAIT SEC

##### MODE OPERATOIRE

Dans une capsule en silice tarée on met 25 ml du spiritueux et on laisse évaporer lentement sur la plaque d'un bain-marie afin d'éviter les projections pendant la première heure. Placer ensuite la capsule directement sur la vapeur pendant deux heures. On laisse refroidir et on pèse (P), ce qui permet de calculer l'extrait sec.

Ensuite le résidu est repris avec un peu d'eau et entraîné dans un bécher. On dose alors par NaOH N/100 en présence de phénolphtaléine soit n ml.

$$\text{Extrait sec} = \frac{P}{25} \times 1000 = 40 \times P \text{ g par 1 d'eau-de-vie analysée}$$

$$\text{Acide fixe} = \frac{240 \times n}{D_r} \text{ en g acide acétique / hl d'alcool à 100 \% vol.}$$

##### ORDRE DE GRANDEUR

1 à 20 g/L pour les rhums

6 à 12 g/L pour les Cognacs

1 à 2 g/L pour les kirsch, eaux-de-vie de marc et de cidre

## ACIDITÉ VOLATILE

La méthode officielle procède par entraînement par la vapeur. La méthode usuelle, que nous appliquerons prend simplement en compte la différence :

Acidité Totale – Acidité Fixe = Acidité Volatile  
en g d'acide acétique par hl d'alcool à 100 % vol.

### ORDRE DE GRANDEUR

- Cognacs : 30 à 100 g / hl d'alcool à 100 % vol.
- Armagnacs : 30 à 200 g/hl d'alcool à 100 % vol.
- Brandies : 10 à 50 g/hl d'alcool à 100 % vol.

### 9.1.4 Dosage des aldéhydes totaux

#### PRINCIPE

On hydrolyse d'abord les acétals (aldéhydes combinée à l'alcool) en milieu aussi dilué que possible et acide. Ensuite, on combine les aldéhydes avec un excès de bisulfite en milieu neutre. On oxyde l'excès de SO<sub>2</sub> par I<sub>2</sub> en milieu acide, puis on titre le SO<sub>2</sub> combiné par I<sub>2</sub> N/10 ou N/100 en milieu alcalin doux (pH 9,5).

#### DOSAGE

Dans un flacon de 500 ml, bouchant émeri :

1. Placer 300 ml d'eau
2. Ajouter 10 ml de solution A, 10 ml de solution E et 50 ml de spiritueux distillé et ramené à 50 % vol. Agiter et laisser 15 minutes en flacon fermé.
3. Ajouter 10 ml de solution B. Agiter et abandonner 15 minutes en flacon bouché.
4. Ajouter 10 ml de solution C, 3 à 4 ml d'empois d'amidon.
5. Agiter et verser l'iode N/10 jusqu'à la coloration bleue de l'empois d'amidon sans excès
6. Ajouter 10 ml de solution D et titrer le SO<sub>2</sub> libéré par l'iode N/10 jusqu'à virage de l'empois d'amidon à la même coloration bleue. Soit **n** ml le volume d'iode employé.

La quantité d'aldéhydes totaux exprimés en éthanal pour un hectolitre d'alcool pur est de **8,98 × n** en grammes. La concentration théorique de 8,8 a été augmentée de 2 % pour tenir compte des 2 % d'éthanal qui reste combiné à la fin de l'hydrolyse acide, parce que le titre alcoométrique est encore égal à 7 % environ.

Solution A : - Métabisulfite de potassium = 15g  
- HCl (d = 1,18) = 70 ml  
- Eau qsp. 1 l

Solution B : - Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O = 200g  
- Eau qsp. 1 l

Solution C : - HCl (d = 1,18) = 250 ml  
- Eau qsp. 1 l

Solution D : - Acide borique = 100 g  
- NaOH pur = 170 g  
- Eau qsp. 1 l

Solution E : - Complexon = 5 g  
- Eau qsp. 1 l

### ORDRE DE GRANDEUR

- 20 à 300 g par hectolitres d'alcool pur (100 en moyenne) pour les eaux-de-vie de marc.
- 5 à 40 g par hectolitres d'alcool pur (22 en moyenne) pour les cognacs et les eaux-de-vie de vin en général.
- 10 à 40 g par hectolitres d'alcool pur pour les rhums.

#### 9.1.5 Dosage du furfural

### PRINCIPE

On développe simultanément sur la solution à doser, et sur une gamme préparée à partir d'une solution étalon, une réaction colorée, avec l'aniline acétique. On compare les couleurs.

### DOSAGE

1. Dans une série de tubes à essais numérotés de 1 à 6, mettre soit 10 ml de distillat ramené à 50 % vol., soit diverses quantités d'une solution de furfural à 5 mg par litre d'alcool à 50 % vol.
2. Compléter à 10 ml avec de l'alcool à 50 % vol.
3. Rajouter dans tous les tubes 0,5 ml d'aniline et 2 ml d'acide acétique.

N° du tube	ml de distillat à 50 % vol.	ml d'alcool à 50 % vol.	ml d'aniline	ml d'acide acétique
0	10	0	0,5	2
	ml de solution de furfural			
1	0	10	0,5	2
2	0,5	9,5	0,5	2
3	1	9	0,5	2
4	1,5	8,5	0,5	2
5	2	8	0,5	2

4. Agiter et attendre 10 minutes avant d'effectuer la lecture.
5. Mesurer l'absorbance à 520 nm.
6. Tracer la courbe étalon, reporter la valeur de l'absorbance sur la courbe d'étalonnage et en déduire la teneur en furfural. La teneur en furfural est exprimée en g de furfural par hl d'alcool pur.

## **ORDRE DE GRANDEUR**

1. Traces à 2,3 g/hl d'alcool à 100 % vol. (moyenne 0,25 g) pour les eaux de vie de vin en général,
2. 1 à 25 g/hl d'alcool à 100 % vol. (moyenne 4 g) pour le cognac,
3. traces à 1,5 g/hl d'alcool à 100 % vol. (moyenne 0,45 g) pour les eaux de vie de marc,
4. 0 à 10 g/hl d'alcool à 100 % (moyenne 1,5 g) pour les rhums.

### **9.1.6 Dosage des esters totaux**

#### **PRINCIPE**

Saponification des esters par un excès de soude 0,1 N après neutralisation des acides et titrage en retour de la soude résiduelle.

#### **DOSAGE**

Dans un erlen de 300 ml :

1. ajouter 100 ml du distillat de l'eau-de-vie, ramené à 50 % vol.,
2. neutraliser dans l'erlen en présence de deux gouttes de phénolphthaléine par NaOH N/10 exactement,
3. ajouter exactement 10 ml de NaOH N/10 en excès,
4. porter à ébullition 1 heure sous réfrigérant à reflux,
5. laisser refroidir un peu et ajouter 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N/10 correspondant exactement à la soude,
6. dégazer à la trompe à vide (5 mm),
7. titrer par NaOH N/10 : soit **n** ml versés.

On exprime les esters en grammes d'acétate d'éthyle par hectolitre d'alcool pur soit :

$$E = 17,6 \times n$$

## REMARQUE

Cette méthode usuelle n'est en théorie applicable que pour le dosage des esters des eaux-de-vie renfermant moins de 50 g d'aldéhyde par hl d'alcool à 100 % vol., sinon il faut utiliser une autre méthode de saponification utilisant le saccharate de calcium (terme impropre) 10 ml d'une solution 0,2 N pour 100 ml de distillat neutralisé, pendant deux heures à température supérieure à 18°C.

## ORDRE DE GRANDEUR

50 à 330 g / hl alcool à 100 % vol. (moyenne (170) pour les eaux-de-vie de vin en général.

90 à 200 g / hl alcool à 100 % vol. (moyenne 140) pour le cognac en particulier.

80 à 900 g / hl alcool à 100 % vol. (moyenne 200) pour les eaux-de-vie de marc.

30 à 3000 g / hl alcool à 100 % vol. pour le rhum, suivant la provenance.

## DISCUSSION DU DOSAGE

- Les aldéhydes, sous l'action des bases se résinifient (aldolisation), d'où une plus grande utilisation de solution de soude. On obtient un résultat trop fort.
- Le caramel et le sucre absorbent une grande quantité de soude pouvant entraîner une erreur atteignant jusqu'à 100 % aussi, il est indispensable d'opérer sur le spiritueux distillé.

## 9.2 Produits œnologiques

### 9.2.1 Indice d'ester et d'acide de l'acide métatartrique

#### INTRODUCTION

On appelle communément acide métatartrique le produit obtenu par déshydratation ménagée de l'acide D-tartrique par la chaleur entre 150 et 170 °C sous la pression atmosphérique ou sous pression réduite. Les principaux constituants de ce produit sont le monoester et le diester ditartrique en proportions variables, provenant de la combinaison de deux molécules d'acide tartrique avec perte d'eau, mélangés à des quantités variables d'acide tartrique non estérifié, d'acide pyruvique et de quantités d'acides polyesters mal connus.

L'acide métatartrique se présente en masses cristallines ou à l'état de poudre, blanches ou plus ou moins colorées en jaune, à faible odeur de pain grillé ou de caramel ; il est très déliquescent. Il est très soluble dans l'eau et dans l'alcool. Il est rapidement hydrolysé en solution aqueuse à 100°, bien plus lentement à froid.

En œnologie, l'ajout d'acide métatartrique est utilisé, à la dose maximale de 10 g/hl, pour inhiber les précipitations tartriques (sous la forme de sels de potassium ou de calcium). Ce produit œnologique joue donc le rôle de « colloïde protecteur » vis-à-vis des microcristaux. Le taux d'estérification de l'acide métatartrique doit être au moins égal à 32 %. Toutefois,

l'utilisation de cet adjuvant doit être raisonnée dans la mesure où son efficacité est à durée variable et difficilement contrôlable selon les conditions de distribution et de commercialisation du vin.

## MODE OPERATOIRE

1. Préparer une solution d'acide métatartrique à 2 % :
  - dans un bécher, peser précisément 2 g d'acide métatartrique,
  - les dissoudre dans environ 75 ml d'eau distillée froide (15 à 25 °C),
  - transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml en rinçant bien le bécher ; compléter à 100 ml.
2. Dans une fiole conique de 250 ml, placer 50 ml (fiole jaugée) de la solution d'acide métatartrique à 2 % préparée précédemment. Ajouter 3 gouttes de bleu de bromothymol (BBT).
3. Titrer à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 1 N jusqu'au virage bleu-vert.  
Soit **n**, le nombre de millilitres employés.
4. Ajouter 20 ml (burette) de solution 1 N d'hydroxyde de sodium. Boucher et abandonner deux heures à température ambiante.
5. Titrer la solution alcaline en excès par une solution d'acide sulfurique 1 N. Soit **n'** le nombre de millilitres employés.

## CALCULS

1 ml de solution d'hydroxyde 1 N d'hydroxyde de sodium correspond à 0,075 g d'acide tartrique.

1. Teneur pour cent en acide total (libre et estérifié) du produit :

$$7,5 \times (n + 20 - n')$$

2. Teneur en ester pour cent de fonction acide totale :

$$\frac{100 \times (20 - n')}{n + 20 - n'}$$

Le produit œnologique doit contenir au minimum 105 % d'acide tartrique total et 32 % d'acide estérifié.

### 9.2.2 Pureté des tanins

#### INTRODUCTION

Le tanin œnologique est retiré soit de la noix de Galle, soit d'un bois riche en tanin : châtaigniers, écorce de chêne, soit des pépins de raisin, etc. Le tanin est composé d'un mélange de glucosides, soit de l'acide gallique et de l'acide ellagique, soit du catéchol, etc.

Le tanin œnologique est blanc jaunâtre ou chamois, de saveur astringente, soluble dans l'eau en totalité ou en partie, soluble dans l'alcool à 95 % vol., en partie soluble dans le glycérol, l'acétate d'éthyle, pratiquement insoluble dans le chloroforme, l'éther, le benzène, les hydrocarbures. La solution aqueuse de tanin donne, avec les sels ferriques, un précipité bleu noir entre 3 et 5 ; ce précipité disparaît par addition d'une petite quantité d'acide fort. La solution aqueuse précipite la gélatine, l'albumine du blanc d'œuf, du sérum sanguin, etc. à pH compris entre 3 et 6 ; elle précipite les alcaloïdes (quinine, strychnine, etc.) entre pH 4 et 6,5.

#### TITRAGE

Préparer une solution (50 ml) à 4 g de **tanin à titrer** par litre.

Préparer une solution (50 ml) à 4 g de **tanin pur** par litre.

Dans un verre cylindrique de 1000 ml placer :

Réactif	1 (ml)	2 (ml)	3 (ml)
Eau	600	600	600
Acide sulfurique 1/10	100	100	100
Solution de sulfate d'indigo (6 g/L)	25	25	25
Solution de <b>tanin pur</b> à 4 g/L	-	10	-
Solution de <b>tanin à titrer</b> à 4 g/L	-	-	10
Volume de solution 0,1 N de permanganate de potassium jusqu'à l'obtention d'une coloration vert-jaune	<b>n<sub>1</sub></b>	<b>n<sub>2</sub></b>	<b>n<sub>3</sub></b>

Agiter continuellement le mélange à doser pendant toute la durée de l'addition de permanganate.

$$\text{Teneur en tanin du produit essayé : } t = 100 \times \frac{n_3 - n_1}{n_2 - n_1}$$

Le produit œnologique doit contenir au minimum 65 % de tanin pur rapporté au produit sec.

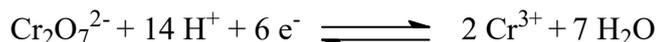
## 9.3 Analyse des vinaigres

### 9.3.1 Dosage de l'alcool par chromométrie

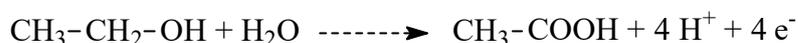
#### PRINCIPE

La teneur en alcool résiduel est le pourcentage en volume d'éthanol encore contenu dans le vinaigre après la fermentation acétique.

La méthode volumétrique quantitative fait appel à une solution oxydante de  $K_2Cr_2O_7$  en milieu acide :



L'alcool est oxydé par un excès de bichromate de potassium en milieu sulfurique :



L'excès de bichromate de potassium est dosé par une solution de sel de Mohr en présence d'orthophénantroline.

La coloration intense donnée par les réactifs (concentrés) rend l'appréciation du virage difficile. On y remédie par retour avec  $KMnO_4$  très dilué.

#### DOSAGE

##### REACTIFS

##### **Bichromate de potassium à 33,791 g/L**

La concentration de cette solution est telle qu'un litre oxyde 10 ml d'alcool pur soit 1 % vol.

##### **Sel de Mohr [ $FeSO_4, (NH_4)_2 SO_4, 6 H_2O$ ] à 135,1 g/L**

La concentration de cette solution est telle que 2 ml équivalent à 1 ml de solution de  $K_2Cr_2O_7$  à 33,791 g/L. (Pour la stabilisation de cette solution, il est conseillé d'ajouter lors de sa préparation 20 ml de  $H_2SO_4$  concentré par litre.)

##### **Permanganate de potassium à 1,089 g/L**

La concentration de cette solution est telle que 10 ml équivalent à 1 ml de la solution de sel de Mohr à 135,1 g/L.

##### **Orthophénantroline ferreuse**

Indicateur d'oxydoréduction, de couleur rouge-brique en milieu oxydant, bleu pâle voir incolore en milieu réducteur.

##### **$H_2SO_4$ au ½ en volume**

#### MODE OPERATOIRE

##### *DISTILLATION*

Introduire 100 ml de vinaigre dans un ballon de distillation. Additionner de lait de chaux jusqu'à l'alcalinisation (50 ml). Entraîner à la vapeur et recueillir environ 45 ml dans une fiole jaugée de 50 ml. Laisser refroidir et porter au trait de jauge avec de l'eau.

## DOSAGE

Il est indispensable avant d'effectuer le dosage, d'étalonner la solution de sel de Mohr qui se détitre assez rapidement.

1. Dans 2 flacons bouchés émeri de 250 ml, placer les solutions suivantes :

	<u>Etalonnage</u>	<u>Dosage</u>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à 33,791 g/L	20 ml	20 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> au ½	20 ml	20 ml
Eau distillée	20 ml	-
Distillat de vinaigre	-	20 ml

*Agiter et attendre 30 minutes au minimum*

*Il est recommandé de boucher les flacons en mouillant le bouchon avec une goutte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ½*

2. Ajouter 0,5 ml d'orthophénatroline ferreuse dans les deux flacons (étalonnage et dosage).
3. Titrer par la solution de sel de Mohr à 135,1 g/L. La coloration passe au vert puis au vert-bleu. Continuer l'addition de solution ferreuse jusqu'au virage au marron. Noter le volume versé, soit **n**<sub>1</sub> pour l'étalonnage et **n'**<sub>1</sub> pour le dosage.
4. Ajuster en retour avec le KMnO<sub>4</sub> à 1,089 g/L jusqu'à disparition brusque de la teinte marron par virage au vert clair. Noter le volume versé, soit **n**<sub>2</sub> pour l'étalonnage et **n'**<sub>2</sub> pour le dosage.

## CALCULS

Volume de sel de Mohr exactement utilisé pour réduire le K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> :

	<u>Etalonnage</u>	<u>Dosage</u>
Alcool		
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>		
Sel de Mohr	n <sub>1</sub>	n' <sub>1</sub>
KMnO <sub>4</sub>	n <sub>2</sub>	n' <sub>2</sub>
soit	$n = n_1 - n_2/10$	$n' = n'_1 - n'_2/10$

## RESULTATS

- 1°) Calculer la quantité de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> correspondant à une solution normale
- 2°) Expliciter les concentrations de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, sel de Mohr et KMnO<sub>4</sub> utilisées pour le dosage chimique de l'alcool
- 3°) Calculer le degré alcoolique du distillat de vinaigre puis du vinaigre

### **9.3.2 Dosage des acidités totale, fixe et volatile**

#### **DETERMINATION DE LA TENEUR EN ACIDITE TOTALE**

On appelle acidité totale d'un vinaigre l'acidité titrable en présence de phénolphtaléine en solution alcoolique, comme indicateur.

##### *PRINCIPE*

Neutralisation des acides de l'échantillon par une solution alcaline.

##### *REACTIFS*

- Solution d'hydroxyde de sodium 0,5 M.
- Indicateur : solution alcoolique de phénolphtaléine à 1 pour 100 ml (dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre 1 g de phénolphtaléine avec une quantité suffisante d'éthanol à 95 % vol. et porter au trait.)

##### *PREPARATION DE L'ECHANTILLON*

Homogénéiser l'échantillon par agitation et filtrer si nécessaire.

##### *TECHNIQUE*

Dans une fiole conique de 250 ml, introduire 10 ml de vinaigre. Additionner d'eau récemment bouillie et froide pour que la solution se présente à peine colorée. Ajouter quelques gouttes de l'indicateur et titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'à coloration rose persistante.

##### *RESULTATS*

Soit V le volume, en ml, de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée dans la titration. La teneur en acidité totale, exprimée en grammes d'acide acétique par litre de l'échantillon, est donné par :  $3 \times V$

Arrondir les résultats exprimés en grammes d'acide acétique par litre à la première décimale.

#### **DETERMINATION DE LA TENEUR EN ACIDITE FIXE**

##### *DEFINITION*

On appelle acidité fixe d'un vinaigre l'ensemble de ses acides fixes (non volatils), titrés en présence de phénolphtaléine en solution alcoolique comme indicateur.

##### *PRINCIPE*

Elimination des substances volatiles du vinaigre, par évaporation.

Neutralisation de acides (non volatils) du résidu, en solution aqueuse, par une solution alcaline.

##### *REACTIFS*

- Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.
- Indicateur : solution alcoolique de phénolphtaléine à 1 pour 100 ml (dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre 1 g de phénolphtaléine avec une quantité suffisante d'éthanol à 95 % vol. et porter au trait.)

##### *PREPARATION DE L'ECHANTILLON*

Homogénéiser l'échantillon par agitation et filtrer si nécessaire.

#### *TECHNIQUE*

Dans un bécher de 300 ml, introduire 10 ml de vinaigre.

Evaporer à sec au bain d'eau. Ajouter 5 à 10 ml d'eau.

Evaporer de nouveau à sec.

Répéter cette opération cinq fois.

Additionner 180 ml environ d'eau récemment bouillie et froide, ajouter quelques gouttes de l'indicateur et titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M jusqu'à coloration rose persistante.

#### *RESULTATS*

Soit  $V$  le volume, en ml, de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée dans la titration.

La teneur en acidité fixe, exprimée en grammes d'acide acétique par litre de l'échantillon, est donnée par :  $0,6 \times V$

Arrondir tes résultats exprimés en grammes d'acide acétique par litre, à la première décimale.

### **DETERMINATION DE LA TENEUR EN ACIDITE VOLATILE**

#### *DEFINITION*

Par convention, on appelle acidité volatile d'un vinaigre la différence entre l'acidité totale et l'acidité fixe.

#### *PRINCIPE*

Calcul de la différence entre l'acidité totale et l'acidité fixe, exprimée en grammes d'acide acétique par litre.

#### *RESULTATS*

Soit  $A_t$  la teneur en acidité totale (exprimée en grammes d'acide acétique par litre de l'échantillon) et  $A_f$  la teneur en acidité fixe (exprimée en grammes d'acide acétique par litre de l'échantillon)

La teneur en acidité volatile, exprimée en grammes d'acide acétique par litre de l'échantillon est donnée par :  $A_t - A_f$ .

Les résultats exprimés en grammes d'acide acétique par litre sont présentés avec la première décimale.

---

---

## 10.1 Introduction–Programme

### Détection et dosage des amines biogènes

Dosage de l’histamine dans un vin par technique immuno-enzymatique de type ELISA : manipulation par binôme

### Traçabilité des cépages

Authentification d’un vin monocépage par amplification PCR de séquences microsatellites caractéristiques de *Vitis vinifera*: manipulation par binôme

### Contrôles d’implantation de levain

Identification d’une souche de *Saccharomyces cerevisiae* par technique de PCR inter- $\delta$ : manipulation par binôme

### Détection précoce et quantification de micro-organismes responsables d’altérations du moût et du vin

Quantification de *Brettanomyces bruxellensis* par PCR Quantitative en temps Réel (QRT-PCR) : manipulation par binôme

### Précautions à prendre en biologie moléculaire

- **Manipuler avec des gants**, afin d’éviter la contamination des réactifs par les nucléases (DNases, RNases) présentes sur les mains
- **Maintenir les réactifs et tubes eppendorf dans la glace**, sauf indication contraire
- **Centrifuger brièvement les réactifs** avant de les ouvrir
- Utiliser les **micro-pipettes et cônes adaptés** aux volumes à prélever
  - P1000** (200 à 1000  $\mu$ l) : cônes **bleus**
  - P200** (20 à 200  $\mu$ l) et **P20** (2 à 20  $\mu$ l) : cônes **jaunes**
  - P10** (2 à 10  $\mu$ l) et **P2** (0,2 à 2  $\mu$ l) : cônes **transparents**

Toujours **contrôler visuellement** le volume prélevé puis déposé.

**Ejecter le cône** dans la poubelle **immédiatement après usage**, afin de ne pas souiller le réactif suivant

- Lors de la préparation d’un mélange réactionnel, déposer en **premier l’eau et les tampons** en homogénéisant par pipetage, puis ajouter les **réactifs** plus précieux (très faibles volumes) **au contact du liquide**. Homogénéiser l’ensemble par **brève centrifugation**
- Après chaque opération de **chauffage des tubes**, penser à les **centrifuger brièvement** afin de récupérer l’eau de condensation
- La visualisation de l’ADN sera réalisée à l’aide d’un **fluorochrome non toxique (GelRed)**, utilisé en remplacement **du bromure d’éthidium (BET)**, agent intercalant de l’ADN et donc **mutagène**.
- Tout déchet souillé de matériel biologique (gels, gants, cônes...) doit être jeté dans la **poubelle « déchets biologiques »**

## 10.2 Protocoles

### 10.2.1 Dosage de l'histamine par kit ELISA

Le kit Histamine ELISA est un test immuno-enzymatique basé sur la méthode ELISA dite « par compétition » qui permet le dosage de l'histamine dans des vins rouges, blancs et pétillants, le lait, le fromage, le poisson frais et en conserves. L'histamine est un produit de décomposition de l'histidine par certaines bactéries. Pour être dosée, l'histamine doit être acylée en N-acylhistamine.

#### ACYLATION

1. Diluer 10 µl de vin à doser dans 5 mL d'H<sub>2</sub>O distillée dans un **tube en plastique**
2. Déposer 100 µl de chaque échantillon (2 contrôles, 6 étalons, vin dilué) dans les puits de la plaque d'acylation
3. Ajouter 25 µl du réactif d'acylation (prêt à l'emploi)
4. Ajouter ensuite 200 µl de tampon d'acylation (prêt à l'emploi)
5. Agiter doucement et incuber **15 mn** à T° ambiante (TA)

#### DOSAGE

Préparer le tampon de lavage pour le dosage ELISA. Ce tampon concentré 50 fois doit être dilué dans de l' H<sub>2</sub>O distillée. En préparer 250 mL.

1. Déposer 25 µl de chaque échantillon acylé (sauf le vin, qui sera déposé en duplicata) dans les puits de la plaque de microtitration contenant l'histamine adsorbée au fond
2. Ajouter 100 µl d'Ac anti-histamine dans chaque puits, homogénéiser à la pipette puis incuber **40 mn** à TA
3. Laver 3 fois en tampon de lavage
4. Ajouter 100 µl de conjugué et incuber **20 mn** à TA
5. Laver 3 fois en tampon de lavage
6. Ajouter 100 µl de solution de substrat chromogène (Tétra Méthyl Benzidine) et incuber **15 mn** à TA à l'**obscurité**.
7. Ajouter 100 µl de solution Stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5N) et lire (dans les 60 mn) l'absorbance à 450 nm.

## INTERPRETER LES RESULTATS

1. Valider l'essai : Absorbance de l'étalon S1 > 0.7
2. Calculer pour chaque standard et échantillon le pourcentage d'absorbance de la façon suivante : absorbance du standard (ou de l'échantillon) / absorbance de S1x100. Tracer la gamme étalon sur du papier semi-log.

$$S_1 = 0 \mu\text{g/L} \quad S_2 = 0.5 \mu\text{g/L} \quad S_3 = 1.5 \mu\text{g/L}$$

$$S_4 = 5 \mu\text{g/L} \quad S_5 = 15 \mu\text{g/L} \quad S_6 = 50 \mu\text{g/L}$$

3. Vérifier les contrôles :  $C_1 = 3 (\pm 40\%) \mu\text{g/L}$   $C_2 = 10 (\pm 40\%) \mu\text{g/L}$
4. Calculer le taux d'histamine contenu dans le vin à tester (ne pas oublier de tenir compte du facteur de dilution).

### **10.2.2 Extraction et purification d'ADN génomique végétal** ***DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)***

Ce kit va permettre d'extraire et de purifier l'ADN génomique de *Vitis vinifera* à partir :

- d'un échantillon de sarment provenant du cépage de référence
- d'un échantillon de vin étiqueté monocépage

A partir de sarments finement broyés dans un moulin à café, incorporer 100 mg de broyat dans un tube « lysing matrix A » et ajouter 400 µl de tampon AP1 et 4 µl de RNase A (100 µg/mL)

Parallèlement, centrifuger l'échantillon de vin 5 mn à 20 000 g, reprendre le culot par 400 µl de tampon AP1 et 4 µl de RNase A (100 µg/mL) et transférer l'ensemble dans un second tube « lysing matrix A »

1. Placer les tubes dans l'agitateur « FastPrep » et réaliser deux cycles d'agitation de 30 '' en maintenant les tubes dans la glace entre les deux cycles
2. Incuber les tubes 10 mn à 65°C en homogénéisant 2-3 fois par inversion
3. Ajouter 130 µl de tampon P3, mélanger et incuber 5 mn dans la glace
4. Centrifuger le lysat 5 mn à 20 000 g
5. Déposer le surnageant dans une colonne « QIA shredder » placée dans un tube de 2 mL et centrifuger 2 mn à 20 000 g
6. Décanter le filtrat dans un tube propre de 1,5mL, sans entraîner de culot, ajouter 1,5 volume de tampon AW1 et mélanger par pipetage
7. Transférer 650 µl du mélange dans une colonne « DNeasy mini » placée dans un tube de 2 mL et centrifuger 1 mn à 6 000 g
8. Eliminer le filtrat et répéter l'étape précédente avec le volume restant
9. Placer la colonne dans un tube propre de 2 mL, ajouter 500 µl de tampon AW2 et centrifuger 1 mn à 6000 g. Eliminer le filtrat
10. Ajouter 500 µl de tampon AW2 et centrifuger 2 mn à 20 000 g
11. Transférer la colonne dans un tube de 1,5 mL
12. Ajouter 100 µl de tampon d'élution AE. Incuber 5 mn à T° ambiante et centrifuger 1 mn à 6000 g
13. Répéter l'étape précédente.

### **10.2.3 Extraction et purification de l'ADN génomique de levures**

**Kit : Wizard Genomic DNA purification (Promega):**

**Application aux levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Brettanomyces bruxellensis***

#### **LYSE DES LEVURES**

1. pipeter 1 mL de bouillon de culture dans un tube eppendorf de 1,5 mL
2. centrifuger 2 mn à vitesse maximale (V max de la centrifugeuse  $\geq 13000g$ )
3. éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 293  $\mu$ l d'EDTA à 50 mM
4. ajouter 7,5  $\mu$ l de lyticase (solution à 20 mg/mL) et homogénéiser par pipetage
5. incubé 30 mn à 37°C et équilibrer à température ambiante (TA)

#### **LYSE DES NOYAUX ET PRECIPITATION DES PROTEINES**

1. centrifuger 2 mn à Vmax
2. éliminer le surnageant et ajouter :  
300  $\mu$ l de solution de lyse des noyaux en homogénéisant par pipetage et  
100  $\mu$ l de solution de précipitation des protéines
3. vortexer 20 secondes à Vmax et incubé 5 mn dans la glace

#### **PRECIPITATION ET LAVAGE DE L'ADN**

1. centrifuger 3 mn à Vmax
2. **recupérer le surnageant** dans un tube propre (1,5 mL) et ajouter 300  $\mu$ l d'isopropanol
3. mélanger par inversion du tube
4. centrifuger 2 mn à Vmax
5. éliminer le surnageant et ajouter 300  $\mu$ l d'éthanol 70%. Mélanger par inversion
6. centrifuger 2 mn à Vmax
7. éliminer le surnageant et laisser sécher le culot 10-15 mn à l'air

#### **ELIMINATION DE L'ARN ET REHYDRATATION DE L'ADN**

1. ajouter 50  $\mu$ l de solution de réhydratation de l'ADN et 2  $\mu$ l de RNase
2. vortexer et centrifuger quelques secondes afin de rassembler tout le liquide
3. incubé 15 mn à 37°C
4. réhydrater l'ADN 1h à 65°C, puis le stocker à 4°C

### **10.2.4 Dosage spectrophotométrique de l'ADN purifié**

1. ajouter 10  $\mu$ l d'ADN purifié à 240  $\mu$ l d'eau *DNase-free* (dilution au 1/25) dans un eppendorf de 1,5 mL. Homogénéiser.
2. transvaser dans une cuve en plastique « spécial UV »
3. mesurer la DO à 260 nm, après avoir effectué le blanc sur l'eau
4. l'appareil intègre le facteur de dilution et donne directement la concentration d'ADN en  $\mu$ g/mL, que vous pouvez vérifier à l'aide de la formule suivante :

**Concentration d'ADN ( $\mu$ g/mL) =  $DO_{260} \times 1/\text{trajet optique (en cm)} \times 1/\text{dilution} \times 50$**   
sachant qu'une concentration d'ADN de 50  $\mu$ g/mL correspond à une  $DO_{260}$  de 1



### 10.2.5 (suite) Amplification par PCR classique

#### **SEQUENCES INTER- $\delta$ DE L'ADN GENOMIQUE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Dans un tube eppendorf de **0,5 mL** maintenu dans la glace, ajouter :

- |    |                                     |   |  |
|----|-------------------------------------|---|--|
| 1. | eau DNase-free (qsp : 50 $\mu$ l)   | x $\mu$ l                                       |  |
| 2. | GoTaq green reaction buffer (5 X)   | 10 $\mu$ l (incluant 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> ) |  |
| 3. | mélange de dNTP (40 mM)             | 1 $\mu$ l                                       |  |
| 4. | amorce $\Delta$ 12 (20 $\mu$ M)     | 3 $\mu$ l                                       |  |
| 5. | amorce $\Delta$ 21 (20 $\mu$ M)     | 3 $\mu$ l                                       |  |
| 6. | 40 ng d'ADN purifié                 | y $\mu$ l                                       | ex: 4 $\mu$ l d'une dilution à 10 $\mu$ g/mL |
| 7. | GoTaq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) | 0,5 $\mu$ l                                     | (= 10 ng/ $\mu$ l)                           |

**Vortexer** et centrifuger brièvement puis maintenir le tube dans la glace jusqu'au placement dans le thermocycler

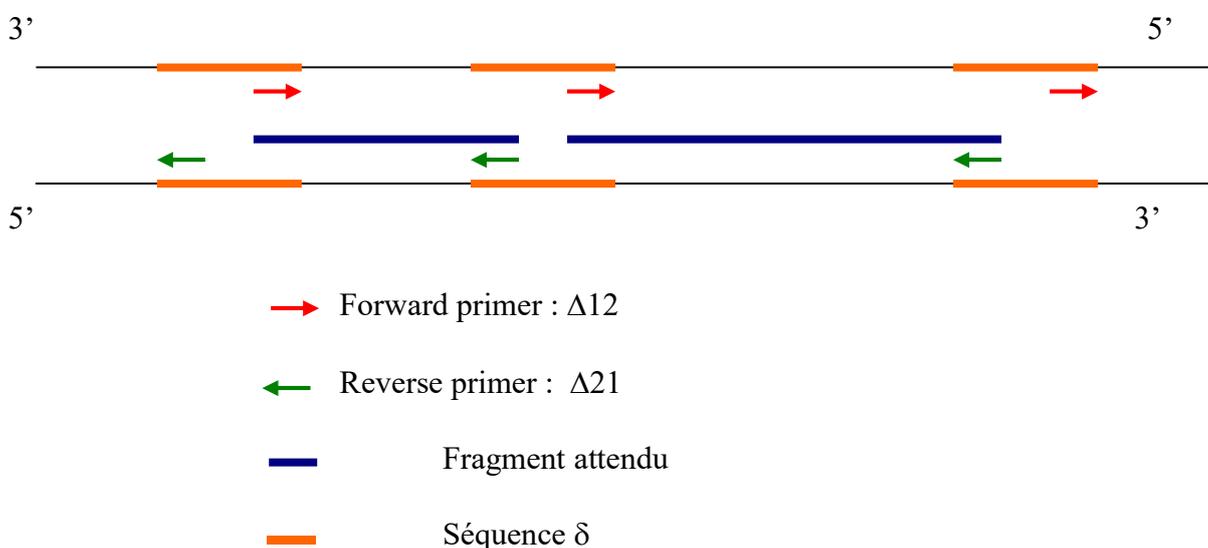
#### **Programme d'amplification : *DNO2***

Dénaturation initiale :	4' à 95°C	
Dénaturation :	30'' à 95°C	x 40 cycles
Hybridation :	30'' à 46°C	
Elongation :	90'' à 72°C	
Elongation finale :	10' à 72°C	
Maintien infini à 4°C		

#### **Primers utilisés :**

**DELTA12-F:** 5'- TCAACAATGGAATCCCAAC -3'

**DELTA21-R:** 5'- CATCTTAACACCGTATATGA -3'



## 10.2.6 Amplification par PCR quantitative en temps réel : QRT-PCR

### Quantification de *Brettanomyces bruxellensis* par amplification du gène *rad4*

Kit : *QuantiFast Sybr green* (Qiagen)

Réaliser une **gamme étalon** par dilution logarithmique de l'**ADN de référence** (purifié à partir du tube renfermant  $10^7$  *Brettanomyces* /mL) en eau *DNase-free*

Préparer un **mix PCR** dans un tube **epENDORF 0,5 mL** : prévoir un volume suffisant, fonction du nombre **n** de tubes **epENDORF 0,5 mL** à analyser (contrôle négatif H<sub>2</sub>O, différents points de la gamme étalon, duplicata de l'échantillon à quantifier)

	<b>n+1</b>	<b>mix</b>		
Eau ultra pure :	10 µl	x	=	µl
Enzyme/reaction mix (2X):	12 µl	x	=	µl
Brett1 Forward primer (20 µM)	1 µl	x	=	µl
Brett2 Reverse primer (20 µM)	1 µl	x	=	µl

Puis répartir ce mix à raison de **24 µl** par tube **epENDORF 0,5 mL**

Dans les tubes correspondants, ajouter :

- soit 1 µl d'ADN (échantillon en duplicata et points de la gamme étalon)
- soit 1 µl d'H<sub>2</sub>O (contrôle négatif)

Homogénéiser et transférer dans la **barrette** de tubes **0,1 mL**

Rq : la Taq polymérase étant « hot-start » on peut charger les tubes à température ambiante. Il faut ensuite les maintenir à 4°C, à l'abri de la lumière jusqu'à analyse (maximum 2 h)

**Amplification** en *Mastercycler realplex* (Eppendorf)

#### Vérification de la T<sub>m</sub> de l'amplicon

par analyse de la courbe de fusion ou **melting curve**

#### Séquence du gène *rad4* de *Brettanomyces bruxellensis* :

```
5' 1 agcttggtc aacatcgaag aagtgaacg gccgcattg cacaatcgtg aagttgcact
61 caacgtctt gcttgagctt ttgacggca tatcgaagac agagatggca attctcgtt
121 tacagtctac ccaggagctt ttccataca tcatgtcgtg gaggaagatc ctaaagatc
181 tgatcaacag cgtggtgcag gtttgggcat catcgggcca ttcgagacc caggttgcg
241 cgttgccct tctaaacaac gtgtcccacg agtatccaaa ggcagtgtg gagattache
301 tcagatgat gtattcaggc tttgtgaaga actgccgccc cacaacgtt cacacaatcc
361 cctcgatcaa ctccagaag aactcgatgg ccgagttgta tggcgaggat gaaagtttg
421 gatacagggt tggattcgag aacattcggc agttggcaat ccacctccgc gagagtgtca
481 acaatctac caagggagag ttacaagggc tktttataca cctggcaggg 3'
```

#### Primers utilisés :

**BRETT1-F:** 5'- CGAAGAAGTTGAACGGCCGCATTTG -3'

**BRETT2-R:** 5' -TCTTCGATATGCCGTCCAAAAGCTC -3'

Portion du gène *radd* de *Brettanomyces bruxellensis*

3' TCGAACCGAGTTGTAGCTTCTCAACTT6CCGGGTAACGTTAGCATTCAACGTTGAGATTGCAGAAACGAACTCGAAAACTCCGATAGCTTCTGTCTCTACCGTTAAGAGCAAAATGTCAGA 5'

5' AGCTTGGCTCAACATCGAAGAAGTTGAACGGCCGCATTGACAAATCGGAAGTTGCACTCAACGTTTGGACGGCATA TCGAAGACAGAGATGGCAATTCGTTTTTACAGTCT 3'

**BRETT1-F:** 5' CGAAGAAGTTGAACGGCCGCATTG 3'

**BRETT2-R:** 5' TCTTCGATATGCCCGTCCAAAAGCTC 3'

- Hybrider les amorces
- Déterminer la longueur de l'amplicon
- Vérifier la  $T_m$  de l'amplicon (76°C) à l'aide de la courbe de fusion

### 10.2.7 Electrophorèse en gel d'agarose

#### **PREPARATION DE GELS D'AGAROSE A 2% EN TAMPON TAE 0,5X**

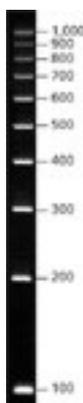
1. peser la quantité d'agarose nécessaire à la réalisation d'un gel (70 mL) et transférer dans un erlen
2. chauffer au micro-onde (en surveillant l'ébullition) afin de dissoudre l'agarose
3. laisser tiédir
4. ajouter le GelRed (concentré 10000X) et homogénéiser
5. placer le peigne adéquat dans le support et couler le gel
6. laisser solidifier

#### **DEPOT DES ECHANTILLONS**

1. retirer délicatement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse en respectant le sens du courant, fonction de la charge de l'ADN
2. ajouter du tampon TAE 0,5X de manière à recouvrir le gel
3. déposer 10 µl de marqueur de poids moléculaire pré-dilué en tampon de charge 6X
4. déposer ensuite les échantillons (20 µl) renfermant le tampon de charge

**MIGRATION**                      100 V pendant 40 mn

#### **VISUALISATION SOUS UV ET NUMERISATION DU GEL**



##### **PCR 100 bp Low Ladder**

Catalog Number **P1473**

Storage Temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

##### **Product Description**

The PCR 100 bp Low Ladder has been especially designed for size determination of PCR generated DNA fragments. The recommended agarose gel concentration is 2.0%.

The ladder contains 10 bands, ranging from 100–1,000 bp in exact 100 bp spaced (ladder) recombinant repeats.

## Product Contents

### 1kb DNA Ladder:

Part No.	Size
G571A	500 $\mu$ l

**Description:** The 1kb DNA Ladder is ideal for determining the size of double-stranded DNA from 250–10,000 base pairs. The ladder consists of 13 double-stranded, blunt-end fragments with sizes of 250/253, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 8,000 and 10,000 base pairs. The 1,000 and 3,000bp fragments have increased intensity relative to the other bands on ethidium bromide-stained agarose gels and serve as reference indicators. All other fragments appear with equal intensity on the gel. All fragments are dephosphorylated by CIAP treatment. However, they are not intended for use in quantitative analysis. Recommended loading volume is 5 $\mu$ l/lane.

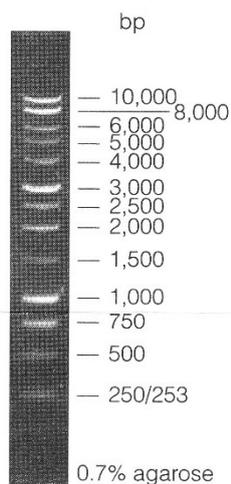
**Storage Buffer:** The 1kb DNA Ladder is supplied in 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA.

**Concentration:** The concentration of the 1kb DNA Ladder is 100 $\mu$ g/ml.

**Storage Conditions:** Store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avoid multiple freeze-thaw cycles and exposure to frequent temperature changes. See the expiration date on the product label.

**Usage Note:** Concentration gradients may form in frozen products and should be dispersed upon thawing. Mix well prior to use.

**Blue/Orange 6X Loading Dye (G190A):** The Blue/Orange 6X Loading Dye supplied with these markers has a composition of 15% Ficoll<sup>®</sup> 400, 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 0.4% orange G, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) and 50mM EDTA. This dye is used for loading DNA samples into gel electrophoresis wells and tracking migration during electrophoresis. Recommended usage is one part loading dye for every five parts DNA solution. The xylene cyanol FF migrates at approximately 4kb, bromophenol blue at approximately 300bp and orange G at approximately 50bp in 0.5% to 1.4% agarose gels in 0.5X TBE (1).



## Product Contents

### dNTP Mix:

Part No.	Size
U151A	200 $\mu$ l
U151B	1,000 $\mu$ l

**Description:** dNTP Mix is a premixed solution containing the sodium salts of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, each at a concentration of 10mM in water. The total concentration of nucleotides, therefore, is 40mM (pH 7.5). Addition of 1 $\mu$ l of dNTP Mix to a 50 $\mu$ l reaction will give a final concentration of 200 $\mu$ M for each dNTP.

**Storage Temperature:** Store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avoid exposure to frequent temperature changes. Mix well prior to use.

**Usage Note:** Concentration gradients may form in frozen products and should be dispersed upon thawing. Mix well prior to use.