

ACIDE L-MALIQUE

Méthode: enzymatique UV

Code produit: KHPE035564

Constitution: 5 x 20 ml (50 tests)

Conservation: 4 - 8 °C

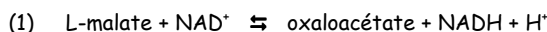
Pour "utilisation in vitro" uniquement

Principe (Réf.1)

En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD), l'acide L-malique (L-malate) est oxydé en oxaloacétate par la L-malate-déshydrogénase (L-MDH) (1).

L'équilibre de la réaction est situé du côté du malate. En éliminant l'oxaloacétate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens L-malate → oxaloacétate.

En présence de L-glutamate, l'oxaloacétate est transformé en L-aspartate (2) par la glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT).



La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de **340 nm**, est proportionnelle à la quantité de L-malate.

L'ajout de PVP au milieu réactionnel est nécessaire pour éviter les interférences dues aux composés phénoliques du vin.

Composition du kit

2 x 100 ml	R1 Tampon "GOOD"
	contient: tampon Good environ 20 mM Acide L-Glutamique 0,1 mM
5 x 20 ml	R2 Lyophilisat
	contient: NAD environ 0,6 mM GOT q.b
1 x 2,5 ml	R3 Enzyme
	contient: L-MDH environ 200 U/l

Préparation et stabilité des solutions

- Lyophilisat reconstitué avec le tampon Good: dissoudre le contenu d'un flacon de R2 avec 20 ml de tampon Good. Agiter délicatement jusqu'à complète dissolution. La solution est stable 1 semaine conservée à 4-8 °C.
- R3 ENZYME (L-MDH): solution prête à l'emploi. Stabilité du réactif jusqu'à la date de péremption du kit, conservée à 4-8°C.

Méthode A. (Mesure par rapport à un étalon à 1 g/l)

Longueur d'onde: 340 nm
Cuvette: 1 cm
Température: ambiante
Volume final: 2.100 ml
Mesure par rapport à l'eau distillée.

Pipeter dans la cuvette	Etalon	Echantillon
ETALON 1 g/l	0,050 ml	
ECHANTILLON		0,050 ml
1. Lyophilisat reconstitué	2,000 ml	2,000 ml

Mélanger délicatement et mesurer l'absorbance (Abs 1) de la solution par rapport à l'eau distillée.

Ajouter successivement:

2. ENZYME	0,050 ml	0,050 ml
-----------	----------	----------

Mélanger et attendre environ 15-20 minutes à température ambiante. Mesurer l'absorbance (Abs 2) de la solution.

Calculer:

$$\frac{\text{Echantillon Abs2-Abs1}}{\text{Etalon Abs2-Abs1}} \times 1 = \text{g/l acide L-Malique}$$

Tout échantillon dont la concentration est supérieur à 1 g/l devra être dilué, le résultat final devra ainsi tenir compte du facteur de dilution.

Lel Δ Abs de l'étalon sera utilisé pour toute la série des échantillons à analyser.

Méthode B. (calcul avec facteur)

Travailler comme pour la méthode A, mais en ne tenant compte que de la colonne Echantillon.

Calculer:

$$\text{Echantillon (Abs2-Abs1)} \times 0,894 = \text{g/l acide L-Malique}$$

Méthode C. (instruments avec cellules à flux)

Longueur d'onde: 340 nm
tube: minimum 3 ml
Température: ambiante
Volume final: 2.050 ml
Mesure par rapport à l'eau distillée.

Préparation du réactif reconditionné: Dans un flacon de R2 reconstitué avec 20 ml de tampon R1 Good*, ajouter 0,5 ml de R3 ENZYME (L-MDH). Mélanger délicatement. La solution est stable 1 semaine conservée à 4-8 °C.

Pipeter dans le tube	Blanc réactif	Etalon	Blanc échantillon	Echantillon
H ₂ O distillée	0,050 ml			
Etalon 1 g/l		0,050 ml		
Echantillon			0,050 ml	0,050 ml
Réactif reconstitué	2,000 ml	2,000 ml		2,000 ml
Tampon Blanc Echantillon R1			2,000 ml	

Mélanger et attendre environ 15-20 minutes à température ambiante. Mesurer l'absorbance (Abs) de la solution finale.

Calculer:

(Abs éch.- Abs blanc réactif.)- Abs blanc échantillon.
----- x 1 = g/l acide L-Malique
(Abs étalon-Abs blanc réactif.)

Spécificité (Réf.1)

Cette méthode est spécifique de l'acide L-Malique.

Linéarité

Pour un volume d'échantillon initial de 0,050 ml et un volume final après réaction de 2,100 ml, la méthode est linéaire jusqu'à environ 3,5 g/l d'acide L-Malique (L-Malate).

Précision (Réf.2)

Dans une double détermination, en utilisant 0.050 ml d'un même échantillon et un volume final après réaction de 2.100 ml, on peut obtenir une différence d'absorbance (Abs) qui varie de 0.010 à 0.015 unité, cela correspond à une concentration en acide L-Malique d'environ 0.008 - 0,013 g/l.

Les valeurs suivantes proviennent de la littérature:

CV = 0.6% - 1.0% solution d'acide L-Malique

CV = 1.8% 12 fois le même échantillon avec une concentration moyenne de 2,97 g/l.

Réactifs, précautions d'usage

Ce kit a été fabriqué pour déterminer l'acide L-Malique dans les aliments et les boissons.

Les réactifs employés ne sont pas considérés comme des substances dangereuses selon la norme communautaire 67/548/ECC et ses modifications ultérieures.

Toutefois il sera opportun de se conformer aux mesures générales de sûreté prévues pour la manipulation des substances chimiques.

Après l'utilisation, les réactifs doivent être stockés en accord avec la réglementation en vigueur. Le matériel présent dans ce kit, pourra être mis dans des poubelles destinées au recyclage.

Préparation de l'échantillon

Généralement non prévisible. *:Pour tous les vins structurés (Polyphénols totaux > 2,5 g/l), les décolorer avec du charbon actif ou une solution de PVP. Ajouter au réactif, 10 % de son volume, en solution mère de PVP.

En cas de fermentation malolactique non effectuée, on conseille de diluer l'échantillon 5 fois (4 ml d'H₂O distillé + 1 ml d'échantillon) puis multiplier le résultat obtenu par le facteur 5.

Bibliographie

- (Réf.1) - Ministero dell'Agricoltura e Foreste (1986) *Approvazione dei Metodi Ufficiali di Analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 161 del 14 luglio 1986.*
- Mollering, H (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Bd.2, S. 1636-1639,a Verlag Chemie, Weinheim and Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed., vol. 3 pp. 1589-1593, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc. New York and London.*
- (Réf.2) - Mollering H. (1985) in *Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., vol. VI, pp 39-47, Verlag Chemie, Weinheim, Deefield Beach/Florida, Basel.*
- *Recueil de méthodes internationales d'analyse des vins et des mouts, Complément nn° 1 a l'édition officielle de juin 1990. Office International de la Vigne et du Vin pp.195-197.*
- (Réf.3) -- *Olschimke, D., Nieser, W. & Junge, Ch 1969 Bestimmung der Apfelsaure in Weinen und Traubensaften, Deutsche Lebensmittel-Rundschau 65, 383-384*

Règlement général

Les réactifs sont prévus pour une utilisation exclusive en laboratoire. On retiendra donc que les personnes, habilitées à la manipulation de substances chimiques, par leur formation et par leur culture, auront prises toutes les précautions d'usage même sans indication explicite sur l'emballage.

Par exemple: toujours porter des lunettes de protection et si possible des gants de protection, éviter le contact avec la peau et les muqueuses, ne pas boire, manger ou fumer dans le laboratoire.

Significations des pictogrammes imprimés



Réactifs pour diagnostic in vitro uniquement



Numérot de Lot



Voir fiche d'information d'utilisation



Fabricant



Distributeur



Date de péremption



Valeurs limites basses et hautes de température de conservation du kit