Connaissance Vigne Vin, 1979, **13**, N° 1, 45-50.

DOSAGE ENZYMATIQUE EN FLUX CONTINU DU GLYCEROL DANS LES VINS

J.-L. BATLLE et Y. COLLON

Institut National de la Recherche Agronomique
Station d'Œnologie et de Technologie Végétale, 11104 Narbonne Cedex

Le glycérol est, après l'eau et l'éthanol, le constituant le plus abondant du vin et la connaissance de sa teneur est importante à des titres divers. Son dosage fait appel à différents types de techniques : colorimétrie, fluorométrie, chromatographie en phase gazeuse, méthodes enzymatiques... Une revue bibliographique sur ce sujet ne peut, sans longueurs, être exhaustive. Nous donnons en fin d'article quelques titres de mémoires parmi les plus importants ou les plus récents.

Quels que soient le principe et la technique utilisés, toutes ces méthodes sont longues ou fastidieuses à mettre en œuvre, surtout sur un grand nombre d'échantillons. C'est pourquoi nous avons essayé d'adapter au flux continu la voie enzymatique de dosage du glycérol, en raison notamment de sa spécificité.

PRINCIPE

Le glycérol est transformé en glycérol-1-phosphate par la glycérokinase (GK) en présence d'adénosine triphosphate (ATP) :

$$(1) \quad \text{glycérol} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{++}]{GK} \text{L(}-\text{)glycérol-1-phosphate} + \text{ADP}$$

Le L(−)glycérol-1-phosphate est oxydé par la glycérol-1-phosphate déhydrogénase (GDH) en présence de nicotinamide adénine dinucléotide

$$(2) \quad \text{L(}-\text{) glycérol-1-phosphate} + \text{NAD} \overset{GDH}{\rightleftharpoons} \text{dihydroxyacétone phosphate} + \text{NADH} + H^+$$

On déplace l'équilibre de la réaction (2) dans le sens NAD ⟶ NADH en présence d'hydrazine en milieu alcalin (pH = 9,8).

La quantité de NADH formée, proportionnelle à celle du glycérol, est mesurée par l'augmentation de l'extinction à 340 nm, longueur d'onde où l'absorption du NADH est maximale.

REACTIFS

a - **Tampon pH = 9,8**

hydrazine hydratée (24 p. 100 p/v)	20,8 g
glycine	1,5 g
Mg Cl_2 1M	0,2 ml

Ajuster à pH = 9,8 avec quelques gouttes de KOH 10 N

Eau bidistillée qsp	100 ml

b - **Solution de NAD** à 12 mg/ml dans de l'eau bidistillée.

c - **Solution d'ATP**

100 mg d'ATP et 500 mg de H $NaCO_3$ sont dissous dans 10 ml d'eau bidistillée.

d - **Solution enzymatique**

500 µl de GK (solution à 1 mg/ml) sont dilués dans 10 ml d'une solution de SO_4 $(NH_4)_2$ 2 M.

D'autre part, 400 µl de GDH (solution à 2 mg/ml) sont dilués dans 10 ml d'une solution de SO_4 $(NH_4)_2$ 2 M.

Toutes les solutions, sauf la solution tampon, sont maintenues dans la glace durant le dosage.

AUTOMATE

L'automate utilisé est schématisé figure 1. Il est composé des éléments suivants :

— un distributeur d'échantillons

— une bobine de délai immergée dans un bain-marie à 37 °C

— un colorimètre équipé d'une cuve à circulation de 10 mm de trajet optique

— un enregistreur.

ETALONNAGE

On prépare les étalons par pesées à partir d'une solution aqueuse de glycérol pour des concentrations s'échelonnant soit de 0 à 6 g/l, soit de 5 à 12 g/l. On peut les contrôler à l'aide des Standards « Précimat Glycérol » de Boehringer Mannheim.

Dans nos conditions opératoires, la courbe d'étalonnage est une droite.

DOSAGE DANS LES VINS

Les échantillons, dilués dans l'eau (3 ml / 100 ml) sont placés sur le distributeur. La dilution manuelle peut être remplacée par une dilution automatique, mais cela ralentirait la cadence de l'automate et entraînerait une consommation plus importante de réactifs enzymatiques.

Sur la chaîne de dosage, chaque échantillon est dilué 10 fois par la solution tampon puis additionné des réactifs ATP, NAD, GK et GDH. Le flux, segmenté par des bulles d'air, circule dans une bobine de délai (40 minutes) puis, après débullage, pénètre dans la cuve du colorimètre. Les densités optiques sont mesurées à 340 nm. On obtient ainsi la valeur E_1.

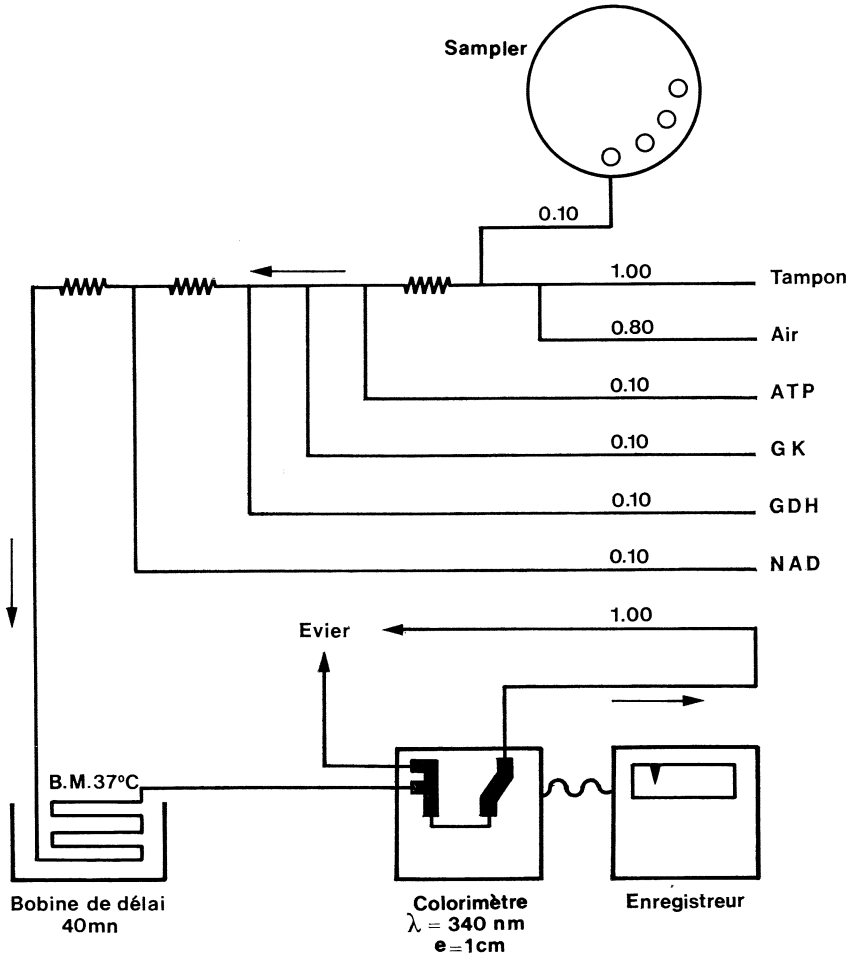


Fig. 1. — Manifod du dosage enzymatique du glycérol dans les vins

Afin d'éliminer l'interférence due aux matières colorantes, une mesure à blanc est faite en remplaçant les réactifs ATP, NAD, GK et GDH par de l'eau. On obtient ainsi la valeur E_2. La densité optique vraie correspondant à la réaction enzymatique est donc $E = E_1 - E_2$. Cette correction, indispensable pour les vins rouges, est inutile pour les vins blancs.

Un blanc « réactifs » est sans intérêt, car le passage périodique (tous les 20 échantillons) de 5 étalons, traités dans les mêmes conditions que les vins, assure un contrôle permanent de la bonne marche de l'automate et de la reproductibilité de la droite d'étalonnage.

REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS

Un exemple de vérification de la reproductibilité des résultats est donné ci-dessous. Il concerne une série de déterminations du glycérol faites sur un vin rouge sec.

TABLEAU I

Reproductibilité du dosage enzymatique du glycérol dans un vin

N°	$E = E_1 - E_2$	Glycérol g/l	e	e^2
1	0,565	8,60	0,05	0,0025
2	0,565	8,60	0,05	0,0025
3	0,555	8,50	0,05	0,0025
4	0,570	8,65	0,10	0,010
5	0,570	8,65	0,10	0,010
6	0,565	8,60	0,05	0,0025
7	0,565	8,60	0,05	0,0025
8	0,555	8,50	0,05	0,0025
9	0,545	8,40	0,15	0,0225
10	0,565	8,60	0,05	0,0025
11	0,580	8,75	0,20	0,040
12	0,555	8,50	0,05	0,0025
13	0,555	8,50	0,05	0,0025
14	0,575	8,70	0,15	0,0225
15	0,560	8,55	0	0
16	0,560	8,55	0	0
17	0,560	8,55	0	0
18	0,555	8,50	0,05	0,0025
19	0,555	8,50	0,05	0,0025
20	0,545	8,40	0,15	0,0225
21	0.550	8,45	0,10	0,010
		$\bar{x} = 8,55$		$\Sigma e^2 = 0,1650$

Pour une valeur moyenne $\bar{x} = 8,55$ et un nombre de mesures $n = 21$, on peut calculer l'écart-type:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma e^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{0,1650}{20}} = 0,091.$$

Pour $n - 1 = 20$ et $P = 0,05$ la table de FISCHER donne $t = 2,086$.

Toute mesure effectuée dans les conditions décrites ci-dessus a donc 95 p. 100 de chances de se trouver dans les limites $\bar{x} \pm \sigma t$, c'est-à-dire entre les valeurs extrêmes 8,35 et 8,75 et d'être connue avec une précision $\frac{\sigma t}{\bar{x}} \cdot 100 = \pm 2{,}2$ p. 100.

CONCLUSIONS

La méthode proposée est fiable et facile à mettre en œuvre. L'analyse en flux continu convient donc bien au dosage enzymatique du glycérol dans les vins. Dans la pratique, les mesures à blanc peuvent se faire pendant le temps de préparation des différentes solutions utilisées pour le dosage et l'intervalle nécessaire pour que la réaction enzymatique survenant dans le premier échantillon soit enregistrée. Dans notre cas, la cadence était de 20 déterminations à l'heure pour un prix de revient unitaire actuel de 4 F (TTC).

Manuscrit reçu le 10 Avril 1979.

RÉSUMÉ

Un procédé de détermination du glycérol dans les vins blancs et les vins rouges est décrit. Les réactifs nécessaires sont la glycérokinase, la glycéroldéhydrogénase, le NAD, l'ATP et une solution tampon à pH 9,8 contenant de l'hydrazine. La quantité de NADH formée par la réaction est mesurée à 340 nm. 20 analyses par heure peuvent être effectuées.

SUMMARY

A procedure for the determination of glycerol in white and red wines is described. The reagents are glycerokinase and glyceroldehydrogenase solutions, NAD and ATP solutions and a pH 9,8 buffer containing hydrazine. The amount of NADH formed in the reaction is mesured at 340nm. Twenty analyses per hour can be made.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren beschrieben zur Feststellung des Glyzerins in den Weissweinen und Rotweinen. Die notwendigen Reaktivstoffe sind die Glyzerokinase, die Glyzerindehydrogenase, NAD, ATP und eine Pufferlösung mit pH 9,8, welche Hydrazin enthält. Die durch die Reaktion gebildete Menge von NADH wird in 340 nm gemessen. 20 Analysen können stündlich vorgenommen werden.

RESUMEN

Un procedimiento de determinación del glicerol en los vinos blancos y tintos se describe. Los reactivos necesarios son la gliceroquinasa, la gliceroldeshidrogenasa, el NAD, la ATP y una solución tampon en pH 9,8 que contiene de la hidracina. La cantidad de NADH formada por la reacción es medida en 340 nm. 20 análisis por hora pueden ser efectuados.

RIASSUNTO

Un processo di determinazione del glicerolo nei vini bianchi e nei vini rossi é descritto. I reattivi necessari sono la glicerochinasi, la glicerolodeidrogenasi, il NAD, l'ATP e una soluzione tampone con pH 9,8 contenente dell'idrazina. La quantitá di NADH formata dalla reazione é misurata a 340 nm. 20 analisi all'ora possono essere effettuate.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AVELLINI P., DAMIANI P., BURINI G., 1977. Fluorometric determination of glycerol in wine. Comparison with other known procedures. *J.A.O.A.C.,* **60** (3), 536-540.

BOEHRINGER Mannheim GBMH. 1977-1978. Methods of enzymatic food analysis.

BUBLITZ C., KENNEDY E.P., 1965. *J. Biol. Chem.,* (211), 951.

CANTAGREL R., SYMONDS P., CARLES J., 1978. Dosage du glycérol dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. *Rev. Franç. Œnologie,* (72), 37-39.

EGGSTEIN M., KULHMANN E., 1974. In BERGMEYER H., Methods of enzymatic analysis, **4,** 1825-1831. Academic Press, New-York.

HOLBACH B., WOLLER R., 1977. Vergleichende Glycerinbestimmung im Wein nach der Methode Rebelein und der enzymatischen Methode. *Die Wein-Wissen.,* RFA, (3), 212-218.

JOYEUX A., LAFITTE M., LAFON-LAFOURCADE S., 1977. Dosage du glycérol dans les vins par la méthode enzymatique. Comparaison avec la méthode chimique. O.I.V., *Feuillet vert* n° 643.

LAFON-LAFOURCADE S., 1973. Dosage enzymatique de la dihydroxyacétone dans les jus de raisins et les vins. *Conn. Vigne Vin,* **7** (3), 171-177.

LAFON-LAFOURCADE S., 1973. Dosages enzymatiques du fructose-1-6-diphosphate et de la dihydroxyacétone-phosphate dans les jus de raisins et les vins. *Conn. Vigne Vin,* **7** (3), 179-187.

Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins, 1978. 209-215. O.I.V.

SUAREZ A., LLAGUNO C., 1975. Dosage du glycérol dans les vins et les vinaigres par voie enzymatique. O.I.V., *Feuillet vert* n° 452/FV582.

WAGNER K., KREUTZER P., 1978. Beitrag zur Glycerinbestimmung in Wein, Likörwein und weinhaltigen Getränken. *Die Wein-Wissen.,* RFA, (2), 109-113.

WIELAND O., 1957. *Biochem Z.,* (329), 313.