DOSAGE ENZYMATIQUE DE LA DI-HYDROXYACETONE DANS LES JUS DE RAISINS ET LES VINS *

M^lle S. LAFON-LAFOURCADE
Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
Institut National de la Recherche Agronomique
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

La di-hydroxyacétone (DA) sous forme d'ester phosphorique (DAP) constitue l'un des produits intermédiaires essentiels de la dégradation catabolique du glucose par les levures au cours de la fermentation alcoolique. Nous avons montré (LAFON-LAFOURCADE, 1973) que la di-hydroxyacétone-phosphate n'est pas habituellement décelable par méthode enzymatique dans les vins, les jus de raisins et les milieux en cours de fermentation. Mais ce composé pourrait subsister dans ces milieux sous sa forme simple. BLOUIN (1965) a pensé mettre en évidence « la présence possible » de di-hydroxyacétone par chromatographie des dinitrophénylhydrazones. Un dosage enzymatique a été indiqué par BERGMEYER (1963) pour ce composé. La méthode est due à WIELAND ; elle a été légèrement modifiée par GAROGLIO (1964), reprise et appliquée par BLOUIN (1965). Aucun de ces auteurs n'a cependant donné une étude détaillée de la mise au point de cette technique. Nous avons essayé de l'appliquer telle qu'elle a été décrite par WIELAND.

Dosage de la di-hydroxyacétone. — La di-hydroxyacétone (DA) est phosphorylée par l'adénosine triphosphate (ATP) en présence de glycérokinase (GK) en di-hydroxyacétone-phosphate DAP.

$$DA + ATP \xrightarrow[Mg^{2}]{GK} DAP + ADP$$

DAP formée est mesurée par sa réduction en glycérol-1-phosphate, par l'α glycérophosphate déhydrogénase (GDH) en présence de NADH.

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

* Travail entrant dans le cadre d'une convention de recherches avec le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux sur la stabilisation biologique des vins blancs.

Une molécule de di-hydroxyacétone oxyde une molécule de NADH. La réaction est suivie au spectrophotomètre par la diminution de densité optique due à l'oxydation de NADH.

Réactifs nécessaires :

— **Solution tampon à la triéthanolamine.** — Dissoudre 0,75 g de triéthanolamine dans de l'eau distillée. Ajouter 0,2 ml d'une solution M de $MgCl_2$; ajuster à pH 7,15 avec 4 ml de HCl N et compléter à 100 ml.

— **NADH.** — Dissoudre 11,2 mg de NADH-Na_2, dans 2 ml d'eau distillée.

— **Solution d'adénosine triphosphate (ATP).** — Dissoudre 60,5 mg de ATP Na_2 H_2, 3 H_2O dans 1 ml d'eau distillée. Neutraliser avec NaOH diluée compléter à 2 ml.

— **Solution d'α glycérophosphate déhydrogénase (GDH).** — Diluer les préparations commerciales pour obtenir une concentration de 7 mg de protéine par ml.

— **Solution de glycérokinase (GK).** — Utiliser les préparations commerciales les plus concentrées.

Mode opératoire :

Les réactions s'effectuent à pH 7,15. Les densités optiques sont relevées à 366 nm. On détermine la différence de densité optique avant et après l'addition d'enzyme dans les cuves contenant l'échantillon à doser et dans une cuve ne contenant que les réactifs (essai à blanc). Dans chacune des cuves on ajoute les réactifs suivants :

	Essai à blanc	Essai
Tampon	2 ml	2 ml
Echantillon	0	x
NADH	0,05	0,05
ATP	0,05	0,05
GDH	0,02	0,02
Eau	x	0
On lit la densité optique	E_1^b	E_1^e
Addition d'enzyme GK	0,02	0,02
On lit la densité optique	E_2^b	E_2^e

A notre connaissance, la durée, même approximative, de la réaction, c'est-à-dire le temps après lequel doit être relevé E_2, n'a été donnée par aucun auteur.

Calculs :

La concentration en DA est donnée selon la loi de LAMBERT-BEER par :

$$C = \frac{\Delta D \times M}{\varepsilon \times e}$$

où :

C = concentration en DA en mg par litre
ΔD = diminution de densité optique due à l'oxydation de DAP formée
$= (E_1^e - E_2^e) - (E_1^b - E_2^b)$
M = masse moléculaire de DA : 90
ε = coefficient d'extinction à 366 nm = $3{,}3\ 10^6$ (cm^2/ mol)
e = épaisseur de la cuve : 1 cm

Il vient :

$$C \text{ mg par litre} = \Delta D \times \frac{1}{3{,}3} \times 90 \times \frac{v}{n} \times 10^{-6} \times 10^6$$

où :

v = volume total du liquide dans la cuve
n = prise d'essai

Dosage de la di-hydroxyacétone en solution simple :

On a suivi la cinétique des réactions enzymatiques, c'est-à-dire la variation de la densité optique en fonction du temps pour différents volumes de prise d'essai de deux solutions de DA de concentrations connues : 15 et 300 mg par litre (fig. 1 et 2). Les courbes obtenues montrent que les réactions enzymatiques sont très lentes. Aux variations très faibles, de densité optique dues à la réaction elle-même, viennent s'ajouter des variations du même ordre de grandeur dues à l'interaction des réactifs entre eux. La forme des courbes ne permet en aucun cas de situer d'une manière précise la fin de la réaction.

Le tableau I indique, pour les différentes prises d'essai des deux solutions étudiées, les variations de densité optique ΔD et les concentration en DA calculées à partir de ces ΔD, après 20 mn et 60 mn.

TABLEAU I

Dosage de la di-hydroxyacétone en solution simple

	Après 20 mn				Après 60 mn		
	Prise d'essai	Δ D 20 mn	mg par l	Erreur (p. 100)	Δ D 60 mn	mg par l	Erreur (p. 100)
Solution à 15 mg par l (1)	0,3 ml	0,032	14,4	— 4	0,052	23	—
	0,4	0,065	14,6	— 2	0,120	27	—
	0,8	0,130	14,6	— 2	0,225	25	—
Solution à 300 mg par l (2)	0,03	0,075	167		0,138	308	+ 2
	0,06	0,160	179		0,250	279	— 7
	0,1	0,245	164		0,385	259	—13

(1) v = 2,24 ml

(2) v = 3,01

Après 20 mn de réaction toute la di-hydroxyacétone est transformée dans les différentes prises d'essai de la solution à 15 mg par litre ; la concentration de la solution est retrouvée avec une bonne précision. Mais

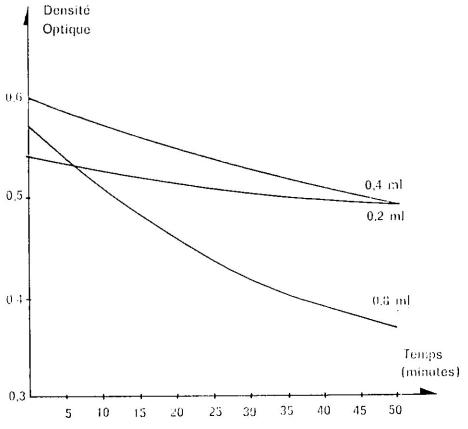


Fig. 1. — Réaction enzymatique du dosage de la di-hydroxyacétone. Variation de D en fonction du temps pour diverses prises d'essai d'une solution à 15 mg par l.

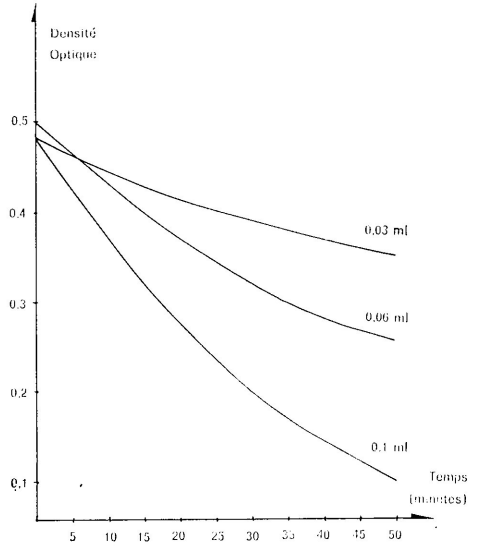


Fig. 2. — Réaction enzymatique du dosage de la di-hydroxyacétone. Variation de D en fonction du temps pour diverses prises d'essai d'une solution à 300 mg par l.

rien dans la forme des courbes ne permet d'estimer qu'on a atteint le terme de la réaction à la vingtième minute.

De même, après 60 mn on a oxydé toute la DA contenue dans 0,03 ml de la solution à 300 mg par litre, mais la réaction n'est pas terminée pour des prises d'essai supérieures et rien ne l'indique dans la forme des courbes.

Ce dosage s'avère donc très incertain, à cause de l'indétermination du terme de la réaction enzymatique sur lequel il est basé.

Application du dosage au vin :

Le vin sur lequel nous avons expérimenté provient d'un jus de raisin blanc fermenté au laboratoire, dépourvu d'anhydride sulfureux. Il est décoloré par 20 g par litre de charbon et amené à pH 7,15 avant d'être soumis au dosage.

Nous avons fait en outre un certain nombre d'additions de DA aux

vins directement dans la cuve à l'aide des solutions de concentrations connues, 15 et 300 mg par litre.

Le tableau II indique pour les différentes prises d'essai et divers enrichissements, les ΔD observées après 30 mn et lorsque cela a été possible, les concentrations correspondantes.

TABLEAU II

Dosage de la di-hydroxyacétone dans le vin

	Solution à 15 mg par l	Solution à 300 mg par l	Vin	ΔD 30 mn	Concentration (mg par l)
Prises d'essai	0,5 ml			0,075	14, l
			1 ml	0,08	non signif.
			0,5	0,07	»
	0,5		0,5	0,06	»
			0,2	0,05	»
	0,5		0,1	0,05	»
			0,1	0,010	»
			0,05	0	0
			0,05	0,025	?
	0,5		0,02	0	0
			0,02	0	0
		0,5 ml	—	0,315	50,6
			0,02	0	54,6
		0,5	0,02	0,340	—
		0,5	0,02	0,060	9,6

La concentration de la solution à 15 mg par litre est retrouvée à 6 p. 100 près à partir de ΔD 30 mn. Mais pour le même temps, les variations de densité optique relatives aux cuves contenant différentes prises d'essai de vin, enrichies ou non en di-hydroxyacétone, ne sont pas utilisables.

Une prise de 0,02 ml de vin additionnée de 0,5 ml de solution à

300 mg par litre de DA présente un D 30 du même ordre de grandeur que 0,5 ml, l'addition de DA n'est pas retrouvée.

Il semble donc : 1°) que ce vin ne peut contenir que des traces de di-hydroxyacétone ; 2°) qu'il inhibe par quelques constituants la réaction enzymatique de base dès que le rapport n/v dépasse 0,02/3, 14 ; 3° que cette inhibition se manifeste d'autant plus fortement que la dose de DA ajoutée est faible.

Conclusion :

L'incertitude de ce dosage enzymatique tient d'une part à l'imprécision du terme de la réaction, d'autre part à des phénomènes d'inhibition produits par des constituants des milieux naturels. Ce dosage n'est donc pas applicable au vin du point de vue quantitatif, mais il nous a permis cependant de montrer que la di-hydroxyacétone ne peut exister dans les moûts, les vins et les milieux de fermentation en quantités notables. On peut donc estimer que le rôle supposé dans les combinaisons de l'anhydride sulfureux est nul ou négligeable.

Manuscrit reçu le 20 Août 1973.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGMEYER H. U., 1963. **Methods of enzymatic analysis.** Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., Academic Press, New York et London.

BLOUIN J., 1966. " Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins, **Ann. Techn. agric., 15, 223 et 359.**

GAROGLIO P. G. et STELLA C., 1964. Micrometodo enzymatico per la determinazione del diidrossiacetone nei vini, **Rivista Vitic. Enol. 17, 241.**

LAFON-LAFOURCADE S., 1973. Dosages enzymatiques du fructose-1-6-di-phosphate et la di-hydroxyacétone-phophate dans les jus de raisins et les vins ; **Conn. Vigne et Vin, 7**, 179.