DOSAGES ENZYMATIQUES DU FRUCTOSE-1,6-DI-PHOSPHATE ET DE LA DI-HYDROXYACETONE-PHOSPHATE 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)

On sait que, au cours de la fermentation alcoolique, le sucre est transformé par les levures à travers une série de réactions d'oxydo-réduction, connue sous le nom de glycolyse.

Une des étapes importantes de la glycolyse, après l'activation du glucose-6-phosphate et son isomérisation en fructose diphosphate, réside dans son clivage sous l'action de l'aldolase en deux molécules de triosephosphate :

Fructose-1,6-di-phosphate $\rightleftharpoons$ di-hydroxyacétone-phosphate + phosphate - 3-glycéraldéhyde.

Le processus enzymatique se poursuit alors aux dépens de ces deux derniers substrats et conduit tout d'abord à l'acide pyruvique, lequel devient à son tour le pivot d'un certain nombre de réactions dont le terme, en ce qui concerne la fermentation alcoolique est constitué essentiellement par l'alcool éthylique, le gaz carbonique et, en quantité moindre, par des substances appelées « produits secondaires ».

Aux différentes étapes de la fermentation alcoolique, apparaissent des composés qu'on suppose transformés dès que parus : « les produits intermédiaires ». Parmi ceux-ci, certains possèdent des fonctions aldéhydiques ou cétoniques et par là, sont susceptibles de se combiner à l'anhydride sulfureux en lui enlevant une fraction non négligeable de son action antiseptique. Il nous a paru intéressant de rechercher dans le jus de raisin et les vins, l'éventuelle présence de ces corps.

Des méthodes enzymatiques de dosage ont été indiquées par BERG-

* 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.

MEYER (1963) pour le fructose-1,6-diphosphate et les triosephosphates notamment. Nous avons essayé de les appliquer et de les adapter à nos milieux. A notre connaissance, cela n'avait pas encore été tenté dans le domaine de l'œnologie.

I. — DOSAGE DU FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHATE ET DES TRIOSEPHOSPHATES

La méthode est due à BUCHER et HOHORST. Elle permet de déterminer trois substances au cours du même dosage.

Principe : La di-hydroxyacétone-phosphate (D A P) est réduite en L glycérol-1-phosphate sous l'action de la glycérol-1-phosphate déhydrogénase (G D A), en présence de N A D H :

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

A pH 7 l'équilibre tend vers la droite et la DAP réagit quantitativement.

Le fructose-1,6-diphosphate (FDP) sous l'action de l'aldolase est scindé en deux triosephosphates :

$$(2)\quad FDP \xrightleftharpoons{\text{aldolase}} \text{phospho-3-glycéraldéhyde} + \text{di-hydroxyacétone phosphate.}$$

La phospho-3-glycéaldéhyde est isomérisée en DAP sous l'action de la triose-phosphate-isomérase : T I M .

$$(3)\quad \text{Phospho-3-glycéraldéhyde} \xrightleftharpoons{TIM} DAP.$$

La réaction tend vers la gauche, mais en couplant les réactions (1) et (3) la balance donne un équilibre qui tend vers la droite et la réaction globale peut s'écrire :

$$(3)\quad FDP + 2\ NADH + 2\ H^+ \rightleftharpoons 2\ \text{glycérol-1-phosphate} + 2\ NAD^+$$

La phospho-3-glycéraldéhyde peut être déterminée en couplant les réactions (1) et (3). La réaction globale s'écrit alors :

(5) Phospho-3-glycéraldéhyde + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$ glycérol-1-phosphate + NAD^+

Toutes ces réactions peuvent être suivies aux différentes étapes, par la diminution de densité optique due à l'oxydation de NADH à 340 nm.

Modification apportée au principe même de la méthode. Cette modification a été rendue nécessaire par le fait que nous n'avons pas trouvé dans le commerce de TIM active.

On peut doser FDP en déterminant la DAP formée par le clivage de l'hexose sous l'action de l'aldolase (2). La réaction globale (4) s'écrit alors :

(6) FDP + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$ glycérol-1-phosphate + phospho-3-glycéraldéhyde + NAD

Dans ce cas, à une molécule de FDP correspond une molécule de NADH.

Mais nous avons dû renoncer au dosage de la phospho-3-glycéraldéhyde pour lequel la TIM est indispensable. Notons que dans les tissus et probablement de la même manière dans les milieux de fermentation où la TIM a existé on subsiste encore, les deux triosephosphates sont présents dans un rapport qui est celui de la réaction d'équilibre, soit une partie de phospho-3-glycéraldéhyde pour vingt de di-hydroxyacétone. Cela devait nous permettre de déterminer approximativement la concentration des milieux en phospho-3-glycéraldéhyde à partir de celle en DAP.

Réactifs utilisés :

— Solution tampon à pH 7,6. Pour 250 ml : 18,6 g de triéthanolamine hydrochloride ; 3,7 g E.D.T.A.Na_2H_2, $2H_2O$. Ajuster à pH 7,6 avec NaOH 2 N.

— Solution NADH : 7 mg de NADH dans 1,5 ml de tampon triéthanolamine.

— Glycérol phosphate déhydrogénase (GDH) : 10 mg de GDH dans 1 ml d'eau distillée.

— Aldolase : 10 mg de protéine dans 1 ml d'eau distillée.

Mode opératoire. — Les réactions s'effectuent à pH 7,6. Les densités optiques sont relevées à 340 nm. On opère directement dans les cuves

du spectrophotomètre de 5 cm de chemin optique. 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	0,5 ml
N A D H	0,01	0,01
Eau	2,5	2
On lit la densité optique deux ou trois fois à 3 mn d'intervalle	$E_1{}^b$	$E_1{}^e$
Addition d'enzyme G D H	0,01	0,01
Après **9 mn** lire deux ou trois fois la densité optique à 3 mn d'intervalle	$E_2{}^b$	$E_2{}^e$
Addition d'aldolase	0,01	0,01
Après **9 mn** lire deux ou trois fois la densité optique à 3 mn d'intervalle	$E_3{}^b$	$E_3{}^e$

Calculs. — La concentration en FDP ou DAP est donnée selon la loi de LAMBERT-BEER par :

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

où :

C : concentration du produit en mg par litre.

ΔD : diminution de la densité optique due à l'oxydation de NADH :

$$\Delta D_{DAP} = (E_1{}^e - E_2{}^e) - (E_1{}^b - E_2{}^b)$$

$$\Delta D_{FDP} = (E_2{}^e - E_3{}^e) - (E_2{}^b - E_3{}^b)$$

M : masse moléculaire $M_{DAP} = 169$; $M_{FDP} = 340$

ε : coefficient d'extinction à 340 nm $= 6{,}22 \times 10^6$ cm2/mol

e : épaisseur de la cuve $= 5$ cm

Il vient :

$$C\ mg/l = \Delta D \times M \times \frac{1}{6,22} \times \frac{v}{n} \times 10^{-5} \times 10^{6}$$

ou

v = volume total des réactifs dans la cuve

n = prise d'essai

Donc :

$$C\ mg/l = \Delta D \times M \times \frac{1}{6,22} \times \frac{v}{n} \times 10^{-6} \times 10^{6}$$

II. — DETERMINATION DE F D P

1) **Solution simple.** — Le dosage a été mis au point sur une solution 10^{-3} M de FDP, soit 340 mg par litre. La réaction est complète après 18 mn. Voici dans le tableau I, pour des prises d'essais variables les ΔD_{FDP} observées et les concentrations en FDP calculées à partir des ΔD_{FDP} relevées.

TABLEAU I

Dosage de FDP en solution simple

Solution à 340 mg par litre en FDP

Prise d'essai	Δ D 18 mn	Concentration (mg par l)
0,02	0,150	339
0,04	0,275	330
0,04	0,28	314
0,04	0,29	324
0,04	0,26	291
0,05	0,35	315
	Moyenne : 319	

On voit que le dosage de FDP en solution simple peut être effectué avec une erreur systématique par défaut de 6 p. 100 en moyenne.

2) **Dosage de FDP dans le vin.** — Le vin sur lequel nous avons expérimenté est un vin rouge que l'on décolore au charbon à raison de 20 g par litre et qu'on amène à pH 7,6 avant de le soumettre au dosage.

Le tableau II indique pour différentes prises d'essai de vin et diverses additions de solution de FDP à 340 mg par litre dans la cuve, les $\Delta D_{18\ mn}$ relevées et les concentrations en FDP calculées à partir des ΔD.

Les ΔD observées pour les différentes prises d'essai de vin sont non significatives.

DOSAGE II

Dosage de FDP dans le vin

Prise d'essai solution à 340 mg (mg par l)	Prise d'essai vin en ml : n	Δ D 18 mn	Concentration en F D P (par ml)	Erreur en (p. 100)
0,02	0	0,135	334	— 1,7
—	0,5	0,008	—	
0,02	0,5	0,13	322	— 5
—	1	0,010	—	
0,02	1	0,125	309	— 9
—	2	0,010	—	
0,02	2	0,068	168	— 50
Volume total dans la cuve : 4,52 ml				

Les additions connues de FDP sont retrouvées avec une bonne précision tant que le rapport n/v reste inférieur à 10 p. 100. Si ce rapport augmente, le volume de vin dans la cuve inhibe la réaction enzymatique et entraîne de grossières erreurs de dosage : 50 p. 100 pour une prise de vin de 2 ml. La prise d'essai d'échantillon doit donc demeurer inférieure à 1 ml.

Avec ces volumes de prise d'essai, les ΔD relevées dans cinq vins différents sont extrêmement faibles. Nous en avons déduit que FDP

n'existe pas dans le vin à des concentrations décelables par la technique enzymatique.

3) **Dosage de FDP dans le jus de raisins.** — L'essai a porté sur un jus de raisins titrant 180 g de sucre par litre. Il a été décoloré et porté à pH 7,6 avant d'être soumis au dosage.

Pour une prise d'essai de jus de raisins de 0,5 ml une addition connue de FDP est retrouvée intégralement. Pour une prise d'essai de 1 ml, l'addition connue de FDP est retrouvée avec une erreur par défaut de 12 p. 100.

Il convient donc d'utiliser des prises d'essai inférieures à 1 ml c'est-à-dire de maintenir le rapport n/v inférieur à 20 p. 100. Mais de même que précédemment, à ces volumes de prise d'essai, les Δ D observées sont négligeables. FDP n'existe pas dans le jus de raisin à des concentrations dosables par cette technique.

4) **Dosage de FDP dans un jus de raisin en fermentation.** — Un jus de raisins à 210 g de sucre par litre est ensemencé, avec **Saccharomyces ellipsoideus** et mis à fermenter en aérobiose à 25 p. 100. Des prélèvements sont effectués pour le dosage de FDP les troisième, septième et neuvième jours de la fermentation. Le tableau III indique les concentrations

TABLEAU III

Dosage des FDP dans les milieux en fermentation

	Prise d'essai ml	Δ D FDP	Concentration en FDP (mg par l)	FDP ajouté (mg par l)	FDP retrouvé après dosage (p. 100)
3e jour	0,5	0	0	340	98
	1	0	0	340	60
	2	0	0	340	43
7e jour	0,5	0	0	340	100
	1	0,025	traces	340	100
	2	0	0	340	52
9e jour	0,5	0	0	340	100
	1	0,001	0	340	100
	1,5	0,023	traces	340	100
	2	0,02	traces	340	50

en FDP dans les milieux de fermentation et dans le cas d'une addition connue de FDP, les pourcentages retrouvés.

En aucun cas les ΔD_{FDP} dans les milieux de fermentation ne présentent une valeur notable. Pour les plus élevés d'entre eux (0,023), cela donnerait une concentration de l'ordre de 10 par litre environ. Si FDP existe dans les milieux en fermentation, c'est donc à des doses pratiquement indécelables par des méthodes enzymatiques.

En outre, le rapport n/v doit rester inférieur à 30 p. 100 pour éviter l'inhibition de la réaction enzymatique par l'échantillon.

5) **Discusion et conclusion.** — L'inhibition exercée par certains constituants du jus de raisins et du vin sur les réactions enzymatiques du dosage de FDP, rendent cette détermination peu sensible et peu précise. Cette inhibition se manifeste lorsque le rapport entre le volume de la prise d'essai et le volume total des réactifs excède 10 à 30 p. 100. Cette inhibition n'est imputable ni aux matières colorantes, ni aux teneurs en anhydride sulfureux, ni au pH des échantillons.

Cependant, le dosage est possible entre certaines limites : prises d'essai inférieures à 1 ou 1,5 ml selon le cas, puisque dans ces conditions, les quantités connues de FDP ajoutées à ces milieux sont retrouvées avec une bonne précision.

D'après les résultats obtenus, dans les limites de validité du dosage enzymatique du fructose-1,6-di-phosphate, nous pouvons conclure que ce composé n'existe qu'à des concentrations très faibles ou nulles dans les vins, les jus de raisins et les milieux en fermentation. Il est probable que le fructose-1,6-di-phosphate, produit intermédiaire de la fermentation alcoolique, est métabolisé au fur-et-à-mesure de sa formation et qu'il n'est pas libéré dans le milieu. Du point de vue technologique, on peut donc être assuré qu'il ne participe pas aux combinaisons de l'anhydride sulfureux.

III. — DETERMINATION DE LA DI-HYDROXYACETONE-PHOSPHATE

Rappelons que les réactions enzymatiques qui constituent la base du dosage de ce composé forment la première partie du dosage de FDP (réactions 1).

Au cours des différents essais relatifs au dosage de FDP dans les jus de raisin, les vins, les milieux en cours de fermentation, nous n'avons jamais observé de variation de densité optique significative après l'addition d'enzyme GDH.

La di-hydroxyacétone-phosphate est très certainement, comme le FDP, un produit intermédiaire transformé dès son apparition et n'existe probablement pas à l'état libre dans les milieux de fermentation. Il ne nous a donc pas semblé utile de mener une étude détaillée de ce dosage.

Manuscrit reçu le 28 mai 1973.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

BERGMEYER H.V., 1963, **Methods of enzymatic analysis,** Verlag Chemie, G.M.B.H. Weinheim/Bergstr. Academic Press, New York and London.