

Validation des dosages enzymatiques des sucres (glucose, fructose, saccharose) et acides (acide citrique et malique) par un spectrophotomètre avec lecteur de microplaques

Caroline Garcia^{1,2}, Catherine Renard^{1,2}

Résumé. Dans l'évaluation de la qualité des fruits et des légumes, il est intéressant de connaître les teneurs en sucres (glucose, fructose, saccharose) et acides (acides citrique et malique) et leur évolution au cours de différents procédés de transformation. Ce travail a permis d'adapter et mettre au point les différentes méthodes de dosages enzymatiques déjà utilisées sur un appareil devenant obsolète sur un appareillage moderne, un spectrophotomètre avec lecteur de microplaques équipé d'un système d'injection automatique. La validation a montré que les méthodes sont répétables et reproductibles et les concentrations des mêmes échantillons analysés sur les deux appareillages sont comparables. Ces dosages spécifiques et simples sont dorénavant réalisés en routine sur le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques.

Mots clés : glucose, fructose, saccharose, acide citrique, acide malique, dosage enzymatique, spectrophotomètre

Introduction

L'unité Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV) de l'INRA d'Avignon effectue des recherches afin d'assurer le maintien de la qualité des aliments à base de fruits et légumes (organoleptique, sanitaire et nutritionnelle) au cours de la fabrication et de la conservation et de contribuer au développement des ressources renouvelables par une meilleure valorisation de leurs co-produits. L'équipe « Qualité des procédés » a pour objectif d'améliorer les produits alimentaires à base de fruits et légumes par une meilleure connaissance de l'impact des procédés de conservation et de transformation, sur la stabilité et la disponibilité des composés du métabolisme primaire et secondaire.

Les sucres et acides sont présents en grande quantité dans de nombreux fruits et légumes et ils déterminent le goût des aliments. Leurs teneurs sont actuellement quantifiées par des méthodes de dosages enzymatiques en flux continu segmenté à l'aide d'un appareillage de marque Hitachi utilisant des cuves et nous souhaitons le remplacer par un appareillage plus moderne, un spectrophotomètre SAFAS avec lecteur de microplaques. Celui-ci est automatisé et tout en consommant moins de réactifs que la méthode préconisée par le fabricant des kits enzymatiques, il a l'avantage de pouvoir analyser de nombreux échantillons en un temps relativement court. Les méthodes actuellement utilisées ont été adaptées (recalcul des volumes et adaptation des temps de réaction) sur le nouvel appareillage. Nous détaillerons l'adaptation, la mise au point des méthodes et la validation réalisée avec un test de répétabilité, un test de reproductibilité, une comparaison de résultats obtenus sur les deux appareillages et la détermination des limites de détection et de quantification.

¹ INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

² Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France.

Matériels et méthodes

Réactifs et solvants

Les dosages sont réalisés à partir de kit enzymatique développé par Boehringer-Mannheim :

Kit pour le dosage du glucose : R-Biopharm ref : 10 716 251 035

Kit pour le dosage du glucose-fructose : R-Biopharm ref : 10 139 106 35

Kit pour le dosage de l'acide citrique : R-Biopharm ref : 10 139 076 035

Kit pour le dosage de l'acide malique: R-Biopharm ref : 10 139 068 035

D-Glucose : Sigma Aldrich ref : G7528 – N° CAS [50-99-7]

Saccharose : Sigma Aldrich ref : S7903 – N° CAS [57-50-1]

β -fructosidase (ou invertase) : Sigma Aldrich ref : I4504 – N° CAS [9001-57-4]

Acide citrique : Sigma Aldrich ref : C1857 - N° CAS [77-92-9]

Multi Acid Standard : R-Biopharm ref : E1241

Appareillage

Homogénéiseur Polytron

Centrifugeuse Hettich 320R

Spectrophotomètre avec lecteur de microplaques (SAFAS FLX-Xenius) équipé d'un dispositif d'injection automatique SAFAS (**Figure 1**)

Bain thermostaté Cryostat à circulation JULABO

Micropipettes volume variable et multi canaux, manuelles et électroniques

Balance de précision

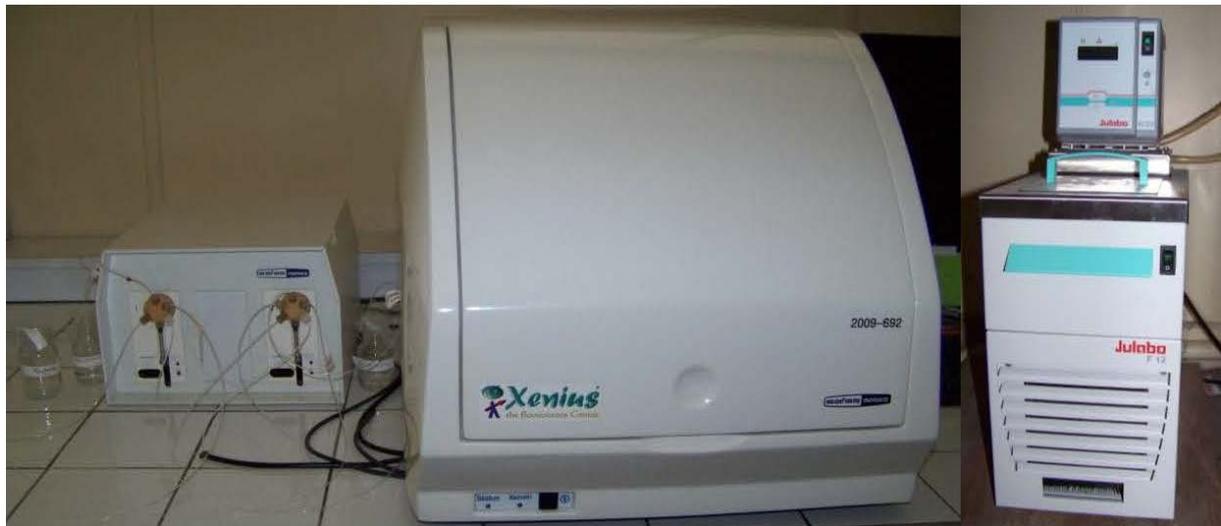


Figure 1. Spectrophotomètre avec lecteur de microplaques, système d'injection automatique et bain thermostaté.

Consommables

Microtubes 2 mL et 1,5 mL
Cônes micropipettes
Microplaques 96 puits Fond F transparent
Barrettes de microtubes
Portoirs, béchers, bac de glace, fioles jaugées, récipients pouvant contenir de l'azote liquide

Extraction des sucres et acides dans les échantillons

Les échantillons sont préalablement broyés, l'extraction est réalisée sur des pulpes conservées à 4°C ou -20°C, des poudres de fruits ou légumes broyées à l'azote liquide et conservées à -80°C, des produits lyophilisés, des produits transformés (ex : purée de tomates).

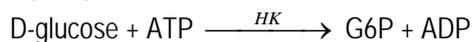
Dans un flacon allant à la centrifugeuse, environ 5 g d'échantillon sont pesés (1g si le produit est lyophilisé), 20 mL d'eau distillée sont ajoutés. Le tout est homogénéisé à l'aide du Polytron pendant 1 min et centrifugé pendant 10 min à 9000 g à 4°C. Le surnageant est filtré sur étamine (toile de nylon), les extraits sont aliquotés dans des microtubes (pour permettre leur prélèvement à l'aide d'une pipette électronique multicanaux) et peuvent être congelés.

Les extraits sont dilués si nécessaire avec de l'eau distillée de manière à se trouver à une concentration comprise dans la gamme du sucre ou de l'acide à doser.

Principe de la méthode

Dosage du glucose

En présence d'Hexokinase (HK) et d'Adénosine-5-Triphosphate (ATP), le D-glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) :



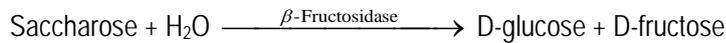
Le G6P est oxydé par le Nicotamide-Adénosine-Dinucléotide (NADP⁺) en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)



La quantité de NADPH formée au cours de la réaction est proportionnelle à celle du D-glucose. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NADPH.

Dosage du saccharose

Le saccharose est hydrolysé par la β -Fructosidase (ou invertase) en D-glucose et D-fructose selon la réaction suivante :

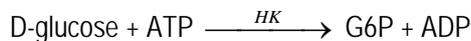


Il s'agit alors de doser le glucose.

La quantité de NADPH formée est proportionnelle à celle du D-glucose formée qui est elle-même proportionnelle à la quantité de saccharose. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NADPH.

Dosage du glucose-fructose

En présence d'Hexokinase (HK) et d'Adénosine-5-Triphosphate (ATP), le D-glucose et le D-fructose sont phosphorylés en glucose-6-phosphate (G6P) et en fructose-6-phosphate (F6P) :



Le F6P est transformé en G6P par la phosphoglucose-isomérase (PGI) :



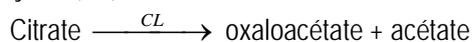
Le G-6-P est oxydé par le Nicotamide-Adénosine-Dinucléotide (NADP⁺) en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)



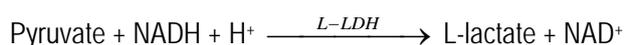
La quantité de NADPH formée au cours de la réaction est proportionnelle à celle du D-glucose et D-fructose. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NADPH.

Dosage de l'acide citrique

L'acide citrique (citrate) est transformé en oxaloacétate et acétate dans la réaction catalysée par l'enzyme citrate lyase (CL):



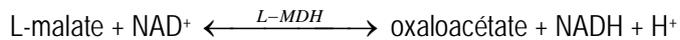
La présence des enzymes L-malate déshydrogénase (L-MDH) et L-lactate déshydrogénase (L-LDH) et du co-facteur nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) permet la réduction de l'oxaloacétate et du pyruvate (produit de décarboxylation de l'oxaloacétate) en L-malate et L-lactate :



La quantité de NADH oxydée et donc ayant disparu au cours des réactions est proportionnelle à celle de l'acide citrique présente dans la solution à doser. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.

Dosage de l'acide malique

En présence de L-malate déshydrogénase (L-MDH) et de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), l'acide L-malique (L-malate) est oxydé en oxaloacétate :



Dans la réaction catalysée par le glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT), l'oxaloacétate est converti en L-aspartate :



La quantité de NADH formée est proportionnelle à celle de l'acide malique présente dans la solution à doser. Les mesures sont effectuées à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.

Mise au point et validation des méthodes

Adaptation et mise au point des méthodes

L'appareillage en flux continu segmenté Hitachi s'utilise avec des cuves pouvant contenir jusqu'à 3 mL, et mesure une densité optique après un temps de réaction fixe de 10 min, ce temps ne peut pas être modifié.

Pour le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques, les puits d'une microplaque peuvent contenir 300 µL maximum. Le logiciel permet de faire des mesures de densité optique à intervalle régulier et trace ainsi la cinétique de la réaction. Les temps des réactions sont donc définis de manière à se trouver au plateau pour tous les points de la gamme d'étalonnage.

Le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques SAFAS est équipé d'un injecteur automatique de réactifs piloté par le système lui-même. Cependant cet injecteur, qui utilise des pompes à seringue, présente beaucoup de volume mort (remplissage des tuyauteries), il faut donc au moins 4 mL de chaque solution pour remplir et rincer le système d'injection.

L'adaptation des méthodes à ce nouvel appareil demande donc d'adapter les volumes (d'échantillons et de réactifs), les concentrations et les durées d'incubation.

Répétabilité

La répétabilité est établie en effectuant six analyses différentes d'un même échantillon avec la même méthode, le même opérateur, dans le même laboratoire utilisant le même appareillage et au cours de la même journée.

Reproductibilité des méthodes

La reproductibilité est établie avec la même méthode, avec différents opérateurs et à des jours différents.

Trois variétés de pommes, d'abricots et de tomates sont broyées à température ambiante, les sucres et acides sont extraits des pulpes. Il est réalisé trois répétitions biologiques et deux répétitions d'analyse.

Comparaison de résultats sur les deux appareillages

Les sucres et acides sont extraits sur 50 échantillons de fruits de la passion lyophilisés et analysés sur l'appareillage à remplacer et le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques.

Limites de détection et de quantification

Ces valeurs sont déterminées sur la base de 10 mesures successives d'un blanc d'eau ultra-pure.

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Densité optique de la LD = densité optique moyenne des 10 blancs + 3*écart-type des 10 mesures de densité optique .

La limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions décrites de la méthode.

Densité optique de la LQ = densité optique moyenne des 10 blancs + 10*écart-type des 10 mesures de densité optique .

Les équations des droites d'étalonnage des sucres et acides permettent de calculer les limites de détection et de quantification en g/L.

Résultats et discussion

Adaptation et mise au point des méthodes

Nous fixons de déposer 5 µL de gamme et d'échantillon, la préparation des solutions contenant les enzymes est revue et le volume introduit dans chaque puits est donc recalculé. Le temps final de réaction est déterminé expérimentalement (atteinte du plateau avec une incubation dans le spectrophotomètre et une thermostatisation de la microplaque à 37°C).

Les paragraphes suivants montrent la finalité des essais de mise au point pour chaque méthode.

Dosage du glucose

Les dosages sont réalisés à partir de kit enzymatique, composition du kit :

Flacon 1 : environ 7,2 g de poudre composée de : Tampon triétanolamine – pH 7,6, NADP – 110 mg, ATP – 260 mg, sulfate de magnésium

Flacon 2 : environ 1,1 mL de solution composée de : Héxokinase – 320 U, Glucose-6-phosphate déshydrogénase – 160 U

Flacon 3 : étalon – concentration notée sur le flacon

Sol S1 : (Injection automatique de 250 µL par puits)

(Cette solution est commune au dosage du glucose et du saccharose, les quantités indiquées sont suffisantes pour 2 plaques entières)

6 mL du flacon 1 (dilué dans 45 mL d'eau ultrapure)

150 µL du flacon 2

44 mL d'eau ultrapure

Le réactif est conservé dans la glace en attendant d'être injecté.

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2014 (81) n° 1

Solution mère de glucose 2 g/L (préparer à l'avance) :

200,0 mg de glucose sont pesés dans une fiole de 100 mL, ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultrapure et agiter jusqu'à dissolution complète.

1 mL de cette solution est aliquote dans des microtubes de 1,5 mL et conserver à -20°C.

Points de gamme :

Les points de gamme sont préparés le jour même, à partir d'une aliquote de solution mère décongelée et homogénéisée, dans des microtubes selon le Tableau ci-dessous :

| Point de gamme | G0 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
|--------------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Volume eau ultrapure (µL) | 200 | 175 | 150 | 125 | 100 | 50 | 0 |
| Volume solution mère (µL) | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 150 | 200 |
| Concentration en glucose (g/L) | 0 | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1,00 | 1,50 | 2,00 |

Agiter au vortex.

Sur chaque microplaque, la première colonne est consacrée à la gamme et les suivantes aux échantillons (éventuellement dilués). Chaque puits reçoit 5 µL de gamme ou d'échantillons et la microplaque est placée dans le lecteur thermostaté à 37°C.

La méthode est alors lancée, ce qui déclenche automatiquement l'injection du réactif ainsi que les agitations de la plaque et l'enregistrement des densités optiques.

Méthode « Glucose » :

La densité optique est mesurée toutes les minutes à partir du lancement de la méthode.

T = 0 : injection de 250 µL de la solution S1 grâce à l'injecteur automatique en voie 1.

L'intervalle entre 2 mesures est de 1 min.

L'agitation de la plaque se fait avant la lecture.

L'analyse dure 10 min.

La densité optique à 10 min est utilisée pour les calculs.

Calcul :

A partir de la droite d'étalonnage de la forme : $y = ax + b$ soit $DO = a \times \text{Conc (GLC)} + b$, la concentration en glucose en g/L de l'échantillon dilué est déterminée.

Calcul de la concentration en g/100g d'échantillon :

$$\frac{\text{conc GLC} \times \text{Dilution GLC} \times (\text{masse} + \text{volume extraction}) \times 100}{(1000 \times \text{masse})}$$

Masse : masse de pulpe de fruit frais ou lyophilisé en g

Volume d'extraction : volume d'eau ajoutée pour l'extraction en mL

Ces concentrations peuvent également être ramenées à la concentration en matières sèches de l'échantillon en divisant par la matière sèche mesurée par ailleurs.

Dosage du glucose-fructose

Les dosages sont réalisés à partir de kit enzymatique, composition du kit :

Flacon 1 : environ 5 g de lyophilisat composée de : Tampon triétanolamine – pH 7,6, NADP – 64 mg, ATP – 160 mg, Sulfate de magnésium ;

Flacon 2 : environ 0,7 mL de solution composée de : Héxokinase – 200 U, Glucose-6-phosphate déshydrogénase – 100 U ;

Flacon 3 : environ 0,7 mL de phosphoglucose-isomérase – 490 U ;

Flacon 4 : étalon – concentration notée sur le flacon.

Sol S1 : (Injection automatique de 250 µL par puits – préparer le jour même)

3 mL du flacon 1 (dilué dans 27 mL d'eau ultrapure) ;

75 µL du flacon 2 ;

75 µL du flacon 3 ;

25 mL d'eau ultrapure.

Le réactif est conservé dans la glace en attendant d'être injecté.

La quantité est suffisante pour une microplaque et peut être ajustée en fonction du nombre de puits.

Solution mère de glucose-fructose 2 g/L (préparer à l'avance) :

Le saccharose est utilisé ici comme standard car il s'agit d'un dimère comportant une molécule de glucose et une molécule de fructose. L'étape d'hydrolyse totale avec l'acide chlorhydrique à 100°C convertit ce dimère en ces deux constituants. Le saccharose présente le gros avantage d'avoir une forme cristalline de haute pureté et stable à l'ambient.

190,0 mg de D+ saccharose sont pesés dans une fiole de 100 mL, ajouter 50 mL d'eau ultrapure et 1 mL d'acide chlorhydrique pur.

Mettre à l'étuve à 100°C pendant 1 heure, laisser refroidir et ajuster à 100 mL.

1 mL de cette solution est aliquoté dans des microtubes de 1,5 mL et conserver à -20°C.

Points de gamme :

Les points de gamme sont préparés le jour même, à partir d'une aliquote de solution mère décongelée et homogénéisée, dans des microtubes selon le Tableau ci-dessous :

| Point de gamme | G0 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
|---|-----|------|------|------|------|------|------|
| Volume eau ultrapure (µL) | 200 | 175 | 150 | 125 | 100 | 50 | 0 |
| Volume solution mère (µL) | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 150 | 200 |
| Concentration en glucose-fructose (g/L) | 0 | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1,00 | 1,50 | 2,00 |

Agiter au vortex.

Sur chaque microplaque, la première colonne est consacrée à la gamme et les suivantes aux échantillons (éventuellement dilués). Chaque puits reçoit 5 µL de gamme ou d'échantillons et la microplaque est placée dans le lecteur thermostaté à 37°C.

La méthode est alors lancée, ce qui déclenche automatiquement l'injection du réactif ainsi que les agitations de la plaque et l'enregistrement des densités optiques.

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2014 (81) n° 1

Méthode « Glucose-Fructose » :

La densité optique est mesurée toutes les minutes à partir du lancement de la méthode.

T = 0 : injection de 250 µL de la solution S1 grâce à l'injecteur automatique en voie 1.

L'agitation de la plaque se fait avant la lecture.

L'analyse dure 16 min.

La densité optique à 16 min est utilisée pour les calculs.

Calcul :

A partir de la droite d'étalonnage de la forme : $y = ax + b$ soit $DO = a \times \text{Conc (GF)} + b$, la concentration en glucose-fructose en g/L de l'échantillon dilué est déterminée.

Calcul de la concentration en g/100g d'échantillon :

$$\frac{(\text{conc GF} \times \text{Dilution GF} - \text{conc GLC} \times \text{Dilution GLC}) \times (\text{masse} + \text{volume extraction}) \times 100}{(1000 \times \text{masse})}$$

Masse : masse de pulpe de fruit frais ou lyophilisé en g

Volume d'extraction : volume d'eau ajoutée pour l'extraction en mL

Ces concentrations peuvent également être ramenées à la concentration en matières sèches de l'échantillon en divisant par la matière sèche mesurée par ailleurs.

Dosage du saccharose

Sol S0 : Solution de β-fructosidase (invertase)

(Injection manuelle de 25 µL par puits – préparer le jour même)

Pour un flacon de β-fructosidase à 330 U/mg :

Peser 12 mg de β-fructosidase et ajouter 6 mL d'eau soit 2 mg/mL.

La masse à peser est à ajuster en fonction du nombre d'U/mg du flacon utilisé.

La quantité de 6 mL est suffisante pour une microplaque et peut être ajustée en fonction du nombre de puits.

Sol S1 : (Injection automatique de 250 µL par puits – préparer le jour même)

(Cette solution est commune au dosage du glucose et du saccharose, les quantités indiquées sont suffisantes pour deux plaques entières)

6 mL du flacon 1 (dilué dans 45 mL d'eau ultrapure) ;

150 µL du flacon 2 ;

44 mL d'eau ultrapure.

Le réactif est conservé dans la glace en attendant d'être injecté.

Solution mère de saccharose 4 g/L (préparer à l'avance) :

400,0 mg de saccharose sont pesés dans une fiole de 100 mL, ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultrapure et agiter jusqu'à dissolution complète.

1 mL de cette solution est aliquote dans des microtubes de 1,5 mL et conserver à -20°C.

Points de gamme :

Les points de gamme sont préparés le jour même, à partir d'une aliquote de solution mère décongelée et homogénéisée, dans des microtubes selon le Tableau ci-dessous :

| Point de gamme | G0 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
|-----------------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Volume eau ultrapure (µL) | 200 | 175 | 150 | 125 | 100 | 50 | 0 |
| Volume solution mère (µL) | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 150 | 200 |
| Concentration en saccharose (g/L) | 0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 3,0 | 4,0 |
| Concentration en glucose (g/L) | 0 | 0,26 | 0,53 | 0,79 | 1,05 | 1,58 | 2,10 |

Agiter au vortex.

On divise par 1,9 la concentration en saccharose pour obtenir la concentration en glucose car 1 mole de saccharose (M=342g) donne 1 mole de glucose (M=180g).

Sur chaque microplaque, la première colonne est consacrée à la gamme et les suivantes aux échantillons (éventuellement dilués). Chaque puits reçoit 5 µL de gamme et d'échantillon (dilué si nécessaire), 25 µL de solution S0 (contenant l'enzyme permettant l'hydrolyse du saccharose présent dans l'échantillon) sont ajoutés à la pipette automatique multicanaux car il n'est pas nécessaire que cette étape soit chronométrée. La microplaque est placée dans le lecteur thermostaté à 37°C.

La méthode est alors lancée, ce qui déclenche automatiquement l'injection du réactif ainsi que les agitations de la plaque et l'enregistrement des densités optiques.

Méthode « Saccharose » :

La densité optique est mesurée toutes les minutes à partir du lancement de la méthode.

A T = 5 min : injection de 250 µL de la solution S1 grâce à l'injecteur automatique en voie 1.

L'agitation de la plaque se fait avant la lecture

L'analyse dure 12 min.

La densité optique à 8 min est utilisée pour les calculs.

Calcul :

A partir de la droite d'étalonnage de la forme : $y = ax + b$ soit $DO = a \times \text{Conc (GLC)} + b$, la concentration en saccharose en g/L de l'échantillon dilué est déterminée.

Calcul de la concentration en g/100g d'échantillon :

$$\frac{(\text{conc SAC} \times \text{Dilution SAC} - \text{conc GLC} \times \text{Dilution GLC}) \times (\text{masse} + \text{volume extraction}) \times 1,9 \times 100}{(1000 \times \text{masse})}$$

Masse : masse de pulpe de fruit frais ou lyophilisé en g

Volume d'extraction : volume d'eau ajoutée pour l'extraction en mL

Ces concentrations peuvent également être ramenées à la concentration en matières sèches de l'échantillon en divisant par la matière sèche mesurée par ailleurs.

Dosage de l'acide citrique

Les dosages sont réalisés à partir de kit enzymatique, composition du kit :

Flacon 1 : environ 1,4g de lyophilisat composé de : Tampon glycyglycine – pH 7,8, L-malate déshydrogénase – 136 U, L-lactate déshydrogénase – 280 U, NADH -5 mg ;

Flacon 2 : environ de citrate lyase – 12U ;

Flacon 3 : étalon – concentration notée sur le flacon.

Sol S1 : (Injection manuelle de 170 µL par puits)

Dissoudre le flacon 1 dans 12 mL d'eau ultrapure.

Sol S2 : (Injection automatique de 135 µL par puits)

Dissoudre le flacon 2 dans 12 mL d'eau ultrapure.

Les réactifs sont conservés dans la glace en attendant d'être injectés.

Solution mère d'acide citrique 1 g/L (préparer à l'avance)

Peser 100,0 mg d'acide citrique dans une fiole de 100 mL, ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultrapure et agiter jusqu'à dissolution complète.

1 mL de cette solution est aliquoté dans des microtubes de 1,5 mL ; conserver à -20°C.

Points de gamme :

Les points de gamme sont préparés le jour même, à partir d'une aliquote de solution mère décongelée et homogénéisée, dans des microtubes selon le Tableau ci-dessous :

| Point de gamme | G0 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Volume eau ultrapure (µL) | 200 | 180 | 160 | 120 | 80 | 40 | 0 |
| Volume solution mère (µL) | 0 | 20 | 40 | 80 | 120 | 160 | 200 |
| Concentration en acide citrique (g/L) | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 |

Agiter au vortex.

Sur chaque microplaque, la première colonne est consacrée à la gamme et les suivantes aux échantillons (éventuellement dilués). Chaque puits reçoit 5 µL de gamme ou d'échantillons, 170 µL de solution S1 sont ajoutés à la pipette automatique multicanaux et la microplaque est placée dans le lecteur thermostaté à 37°C.

La méthode est alors lancée, ce qui déclenche automatiquement l'injection du réactif ainsi que les agitations de la plaque et l'enregistrement des densités optiques.

Méthode « acide citrique » :

La densité optique est mesurée toutes les minutes à partir du lancement de la méthode.

A T = 5 min : injection de 135 µL de la solution S2 grâce à l'injecteur automatique en voie 1.

L'agitation de la plaque se fait avant la lecture.

L'analyse dure 16 min.

La différence entre la densité optique à 16 min et celle à 3 min est utilisée pour les calculs.

Calcul :

A partir de la droite d'étalonnage de la forme : $y = ax + b$ soit $DO = a \times \text{Conc (CI)} + b$, la concentration en acide citrique en g/L dans l'échantillon dilué est déterminée.

Calcul de la concentration en mmol COOH/100g d'échantillon :

$$\frac{\text{conc CI} \times \text{Dilution CI} \times (\text{masse} + \text{volume extraction}) \times 100}{(64 \times \text{masse})}$$

Masse : masse de pulpe de fruit frais ou lyophilisé en g.

Volume d'extraction : volume d'eau ajoutée pour l'extraction en mL.

La masse molaire de l'acide citrique est de 192 g/mol, c'est un triacide donc $192/3=64\text{g}$ pour une fonction COOH.

Ces concentrations peuvent également être ramenées à la concentration en matières sèches de l'échantillon en divisant par la matière sèche mesurée par ailleurs.

Dosage de l'acide malique

Les dosages sont réalisés à partir de kit enzymatique, composition du kit :

Flacon 1 : environ 30 mL de solution composée de : Tampon glycylglycine – pH 10,0, Acide L-glutamique – 440 mg ;

Flacon 2 : β -NAD – 210 mg ;

Flacon 3 : environ 0,4 mL de glutamate-oxaloacétate-transaminase (160 U) ;

Flacon 4 : environ 0,4 mL de L-malate déshydrogénase (2400 U) ;

Flacon 5 : étalon – concentration notée sur le flacon.

Sol S1 : (Injection automatique de 250 μL par puits)

6 mL du flacon 1 ;

1,2 mL du flacon 2 (dilué dans 6 mL d'eau ultrapure) ;

75 μL du flacon 3 ;

75 μL du flacon 4 ;

22 mL d'eau ultrapure.

Le réactif est conservé dans la glace en attendant d'être injecté.

La quantité est suffisante pour une microplaque et peut être ajustée en fonction du nombre de puits.

Solution mère d'acide malique 1 g/L (préparer à l'avance) :

L'acide malique en poudre n'étant pas stable (hygroscopique), nous utilisons un standard pré-dissous du commerce, ensuite dilué pour obtenir la concentration de 1 g/L.

Exemple : Conc (acide malique) = 4,7g/L

$$V(\text{sol.mère}) = \frac{\text{Conc}(\text{sol.fille}) \times V(\text{sol.fille})}{\text{Conc}(\text{sol.mère})}$$

$$\text{Soit : } V(\text{sol.mère}) = \frac{1 \times 1}{4,7}$$

$$\text{Soit : } V(\text{sol.mère}) = 0.213 \text{ mL ou } 213 \mu\text{L}$$

Introduire 213 μL de la solution standard multi-acides et ajouter 787 μL d'eau ultrapure pour obtenir une solution à 1 g/L.

Points de gamme :

Les points de gamme sont préparés le jour même, à partir de la solution mère décongelée et homogénéisée, dans des microtubes selon le Tableau ci-dessous :

| Point de gamme | G0 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Volume eau ultrapure (µL) | 200 | 180 | 160 | 120 | 80 | 40 | 0 |
| Volume solution mère (µL) | 0 | 20 | 40 | 80 | 120 | 160 | 200 |
| Concentration acide malique (g/L) | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 |

Agiter au vortex.

Sur chaque microplaque, la première colonne est consacrée à la gamme et les suivantes aux échantillons (éventuellement dilués). Chaque puits reçoit 5 µL de gamme ou d'échantillons et la microplaque est placée dans le lecteur thermostaté à 37°C.

La méthode est alors lancée, ce qui déclenche automatiquement l'injection du réactif ainsi que les agitations de la plaque et l'enregistrement des densités optiques.

Méthode « acide malique » :

La densité optique est mesurée toutes les minutes à partir du lancement de la méthode.

T = 0 : injection de 250 µL de la solution S1 grâce à l'injecteur automatique en voie 1.

L'agitation de la plaque se fait avant la lecture.

L'analyse dure 6 min.

La densité optique à 6 min est utilisée pour les calculs.

Calcul :

A partir de la droite d'étalonnage de la forme : $y = ax + b$ soit $DO = a \times \text{Conc (MA)} + b$, la concentration en glucose-fructose dans l'échantillon dilué est déterminée.

Calcul de la concentration en mmol COOH/100g d'échantillon :

$$\frac{\text{conc MA} \times \text{Dilution MA} \times (\text{masse} + \text{volume extraction}) \times 100}{(67 \times \text{masse})}$$

Masse : masse de pulpe de fruit frais ou lyophilisé en g

Volume d'extraction : volume d'eau ajoutée pour l'extraction en mL

La masse molaire de l'acide citrique est de 134 g/mol, c'est un diacide donc $134/2=67$ g pour une fonction COOH.

Ces concentrations peuvent également être ramenées à la concentration en matières sèches de l'échantillon en divisant par la matière sèche mesurée par ailleurs.

Cinétique des réactions

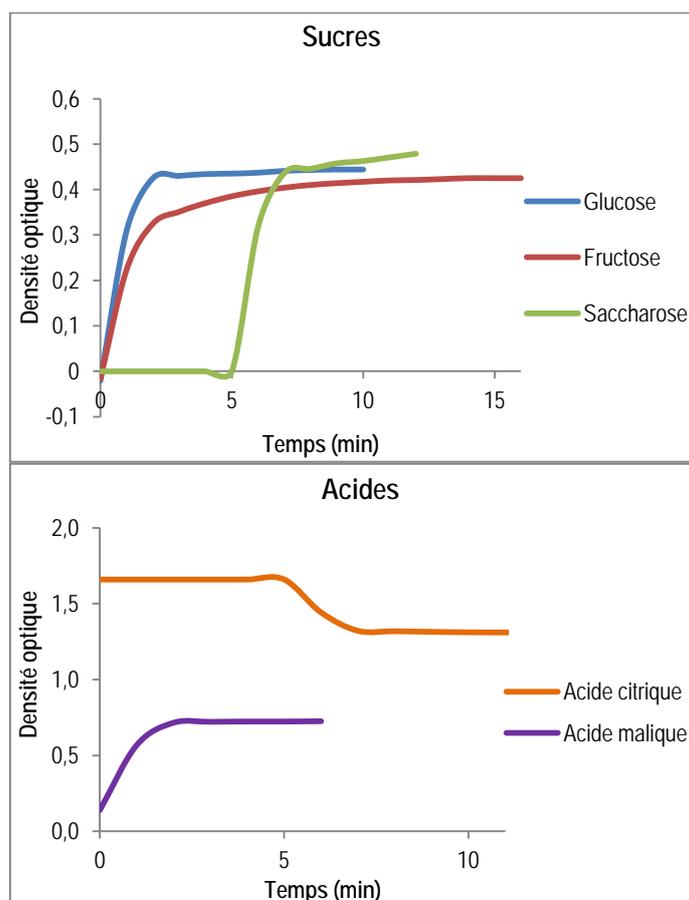


Figure 2. Cinétique des points de gamme à 1 g/L du glucose, fructose, saccharose, acide citrique et malique.

Pour le dosage du glucose, du fructose et de l'acide malique, les densités optiques à respectivement 10 min, 16 min et 6 min sont utilisées dans les calculs. Les densités optiques s'étendent de 0 à environ 1 pour les gammes d'étalonnages.

Pour doser le saccharose, la méthode mesure le glucose libéré lors de l'hydrolyse par la fructosidase. Comme le fructose, également libéré est lentement converti en glucose lui aussi, il est nécessaire d'utiliser une calibration « interne » pour choisir le point de lecture. Pour ceci, un étalon de glucose pur est utilisé, à 0,5g/L. On considère que la réaction est totale lorsque la densité optique de l'étalon de saccharose à 1g/L est la même que celle du glucose à 0,5g/L, c'est à dire à environ 8 min.

Pour le dosage de l'acide citrique, la différence de densité optique entre le premier et le dernier point de gamme est faible, environ 0,4. Il est nécessaire de prendre en compte la densité optique avant l'ajout de la solution S2. La différence de densité optique entre 16 et 3 minutes est utilisée pour les calculs.

Répétabilité

Les densités optiques obtenues sur un même échantillon sont notées et illustrées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Répétabilité

| | Glucose | Fructose | Saccharose | Acide citrique | Acide malique |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| Densité optique 1 | 0,228 | 0,232 | 0,236 | -0,119 | 0,273 |
| Densité optique 2 | 0,230 | 0,236 | 0,229 | -0,116 | 0,257 |
| Densité optique 3 | 0,237 | 0,238 | 0,231 | -0,110 | 0,252 |
| Densité optique 4 | 0,236 | 0,245 | 0,228 | -0,115 | 0,257 |
| Densité optique 5 | 0,229 | 0,241 | 0,235 | -0,121 | 0,259 |
| Densité optique 6 | 0,232 | 0,241 | 0,228 | -0,120 | 0,260 |
| Moyenne | 0,232 | 0,239 | 0,231 | 0,117 | 0,260 |
| Ecart-type | 0,0037 | 0,0045 | 0,0035 | 0,0041 | 0,0071 |
| CV (%) | 1,61 | 1,90 | 1,53 | 3,48 | 2,73 |

Les coefficients de variation obtenus pour chaque dosage sont très faibles et montrent qu'un seul dépôt par extraction est suffisant.

La répétabilité est satisfaisante.

Reproductibilité des méthodes

A partir des résultats obtenus, il est établi des graphiques montrant la concordance des résultats entre les deux opérateurs sur des jours différents, ceci est illustré dans les **Figures 3 et 4**.

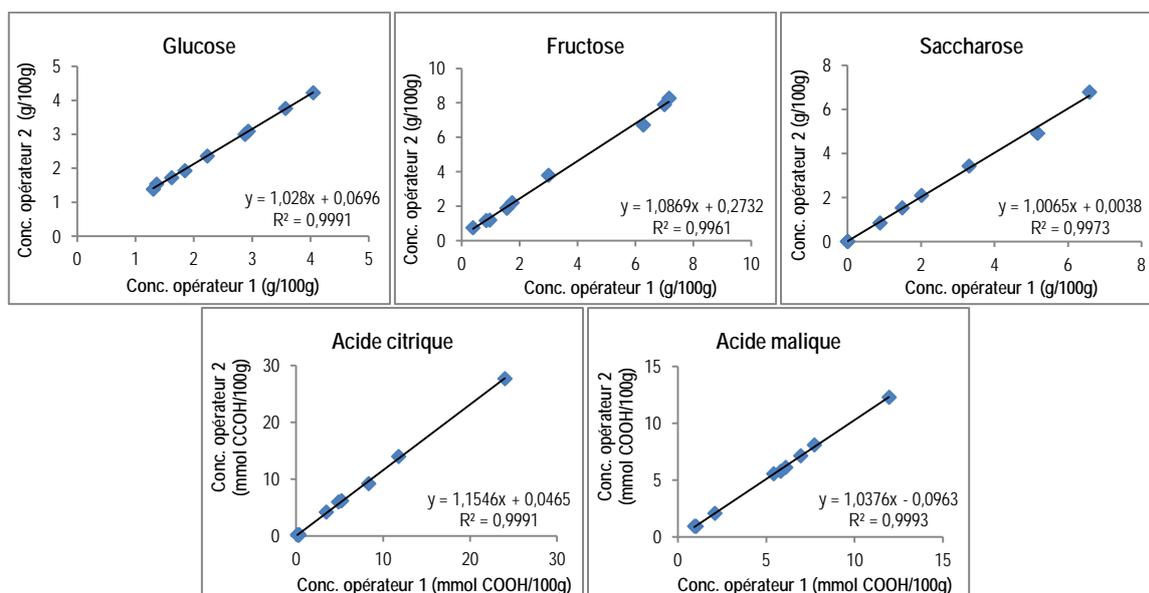


Figure 3. Teneur en différents sucres et acides de l'opérateur 1 en fonction des résultats, obtenus par l'opérateur 2.

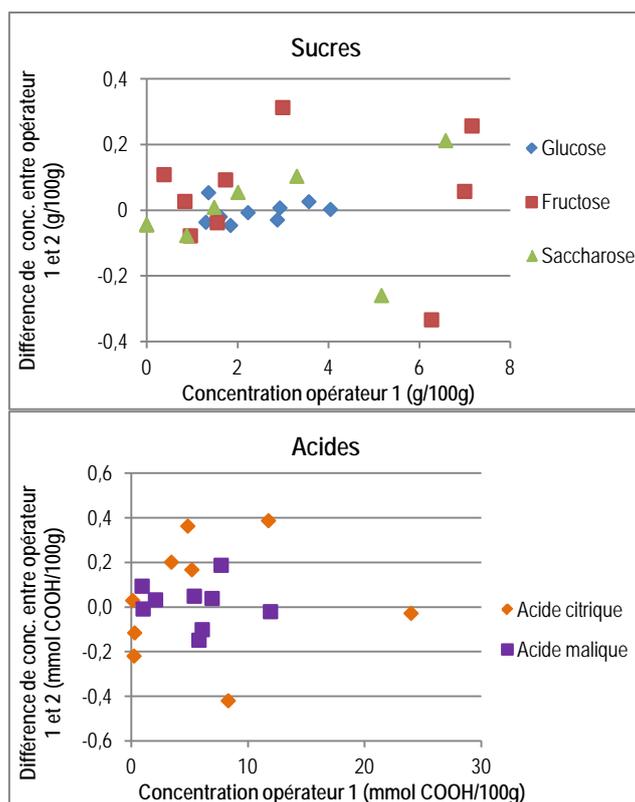


Figure 4. Analyse des différences de concentrations obtenues entre l'opérateur 1 et l'opérateur 2.

Les droites ont un coefficient directeur et un coefficient de corrélation proche de 1. L'analyse des différences obtenues entre l'opérateur 1 et l'opérateur 2 montre une faible distribution autour de 0, donc une absence de biais systématique.

En changeant d'opérateur et de jour, les résultats restent identiques, la reproductibilité des méthodes de dosage est donc satisfaisante.

Comparaison de résultats sur les deux appareillages

L'appareillage en flux continu segmenté Hitachi permet d'analyser 50 échantillons maximum en une session, qui dure environ 1h. Il effectue d'abord une calibration et ensuite l'analyse des échantillons puis des rinçages. Au préalable, les dilutions des échantillons s'effectuent une à une et doivent être centrifugées.

Le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques SAFAS permet d'analyser 88 échantillons maximum, les réactions durent entre 6 et 16 min. Les dilutions des échantillons et les dépôts sur la microplaque sont optimisés grâce à l'utilisation de barrettes de microtubes et de pipettes électroniques multicanaux.

Ce dernier a l'avantage de doser plus d'échantillons en un temps plus court.

Des analyses sont réalisées en parallèle sur les deux appareillages, la concordance des résultats est illustrée dans la Figure 5.

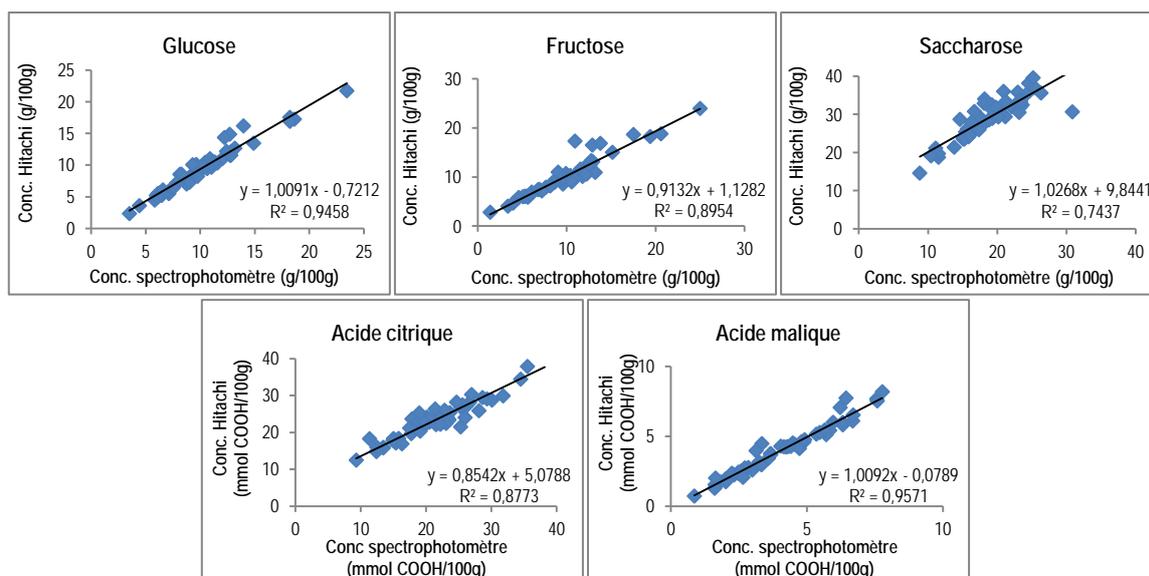


Figure 5. Teneurs en différents sucres et acides de l'ancien appareillage Hitachi en fonction du spectrophotomètre avec lecteur de microplaques.

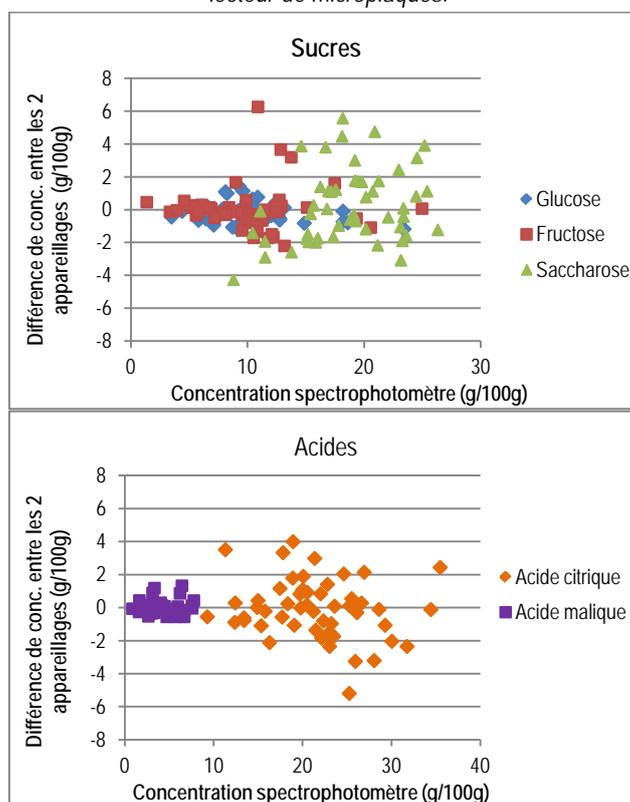


Figure 6. Analyse des différences obtenues entre le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques et l'ancien appareillage Hitachi.

Pour le glucose, le fructose, le saccharose et l'acide malique, les droites ont un coefficient directeur et un coefficient de corrélation proche de 1. Pour l'acide citrique, la corrélation entre les deux appareillages est un peu moins bonne mais acceptable. L'analyse des différences obtenus entre le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques et l'ancien appareillage Hitachi ne montrent pas de biais systématique, mais une répartition autour de 0, même si des différences plus grandes sont constatées pour les sucres minoritaires que sont le fructose et surtout le saccharose.

Les **Figures 5 et 6** confirment que l'ancien appareillage Hitachi peut être remplacé par le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques sans induire de rupture dans les séries d'observation pluriannuelles.

Limites de détection et de quantification

Dix mesures successives d'un blanc d'eau ultrapure sont réalisées, les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) calculées sont reportées dans le **Tableau 2**.

| | Glucose | Fructose | Saccharose | Acide citrique | Acide malique |
|-------------|---------|----------|------------|----------------|---------------|
| DO moyenne | 0,017 | 0,028 | 0,018 | -0,030 | 0,109 |
| Ecart-type | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,001 |
| DO de la LD | 0,023 | 0,037 | 0,027 | -0,039 | 0,112 |
| DO de la LQ | 0,037 | 0,058 | 0,048 | -0,060 | 0,119 |
| LD en g/L | 0,065 | 0,099 | 0,042 | 0,089 | 0,000 |
| LQ en g/L | 0,096 | 0,145 | 0,086 | 0,149 | 0,017 |

Tableau 2. Estimation des limites de détection et quantification

Les limites de détection et de quantification sont déterminées, il faut penser à prendre en compte les éventuelles dilutions des extractions.

Conclusions et perspectives

Les méthodes de dosage des sucres (glucose, fructose, saccharose) et acides (acide citrique et malique) sont validées sur le spectrophotomètre avec lecteur de microplaques. Cet appareillage a l'avantage d'être plus moderne, de doser plus d'échantillons en moins de temps, d'être équipé d'un injecteur automatique et de pouvoir suivre la cinétique des réactions et donc d'être plus confiant dans le bon déroulement des réactions enzymatiques. Les méthodes mises au point ont montré une très bonne répétabilité, un seul dépôt est donc suffisant. Par contre, nous savons qu'il existe des différences de composition de fruit à fruit, nous pratiquons systématiquement trois répétitions biologiques (trois échantillonnages de fruits ou trois extractions d'une même pulpe). La préparation des échantillons et de la microplaque est optimisée en utilisant des pipettes électroniques multicanaux. Pour le dosage de l'acide citrique, la différence de densité optique entre le premier point de gamme et le dernier est faible (environ 0,4), ce qui laisse penser qu'il serait possible d'adapter la méthode à des concentrations supérieures à celles couramment rencontrées dans les fruits.

Références bibliographiques

BOEHRINGER MANNHEIM Enzymatic Bioanalysis Catalogue 2000, Wang et al (Journal of Food Science Vol 58, N°3, 1993).

JK TAYLOR, Quality Assurance of Chemical Measurements, Lewis Publishers INC, Chelsea, USA, 1988, page 15 à 39.