

NOTE

OPTIMISATION DE LA METHODE DE DOSAGE DE L'ACTIVITE LACCASE DE *BOTRYTIS CINEREA* PAR LA SYRINGALDAZINE

Catherine GRASSIN* et D. DUBOURDIEU

Institut d'Enologie, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

La mesure de l'activité laccase (E.C. 1.10.3.2.) de jus de raisins par la méthode à la syringaldazine (DUBOURDIEU et *al.*, 1984) permet d'apprécier la contamination de la vendange par *Botrytis cinerea*.

Nous précisons et améliorons cette technique de dosage pour l'appliquer au contrôle rapide de l'état sanitaire des moûts et des vins nouveaux.

I. — CHOIX D'UNE RESINE ADSORBANTE DES COMPOSES PHENOLIQUES.

Pour doser l'activité laccase de façon optimale, l'élimination des composés phénoliques du moût est indispensable. Celle-ci peut être réalisée par passage du jus de raisin sur une résine susceptible d'adsorber les composés phénoliques.

Plusieurs résines ont été testées (kit Bond Elut, Analytichem International Harbor City - USA) ; elles sont fournies à l'état sec et conditionnées en petites colonnes contenant chacune 100 mg de poudre tassée. Des aliquotes de 0,5 ml d'un moût de raisins blancs partiellement botrytisés (contenant environ 10 unités laccase par millilitre) sont déposées sur chaque type de résine. Après percolation, on recueille 0,33 ml de jus : la diminution du volume des échantillons est due à l'imbibition du support sec.

La différence de densité optique à 280 nm du jus dilué au 1/10 avant et après les différents traitements est un indice du taux de fixation des composés phénoliques par la colonne.

En outre, la comparaison de l'activité laccase des échantillons issus des différents traitements permet de déterminer la résine qui retient le plus d'inhibiteurs phénoliques sans dénaturation de l'enzyme. Dans nos essais, les meilleurs résultats sont obtenus avec la P.V.P.P. (Tableau I).

* Stagiaire de recherches à la Société SOPRA.

TABLEAU I

**Densité optique à 280 nm et activité laccase d'un moût botrytisé
traité par différentes résines échangeuses d'ions
(0,5 ml de moût pour 100 mg de résine)**

Type de résine Kit Bond Elut	DO 280 nm composés phénoliques totaux	Activité laccase U/ml	% de l'activité laccase du témoin brut
Témoin jus brut	0,632	9,3	100
Polyvinyl polypyrrolidone	0,480	11*	118
SAX amino IV	0,172	9,3** 5,5	60
NH ₂ amino propyle	0,350	5,3	57
SCX acide benzène sulfonique	0,537	0	0
CN cyanopropyle	0,525	10,4	111
C ₂ éthyle	0,532	7,6	81
CBA acide carboxylique	0,489	7,4	79
SI silice	0,540	10,4	111
2 OH diol	0,522	10	107
C M cyclohexyle	0,543	7,7	82
PH phényle	0,366	3,5	37
C 8 octyle	0,546	7	75
C 18 octadecyle	0,513	7	75
Trisacryl		0	0
XAD ₂		6,2	67

* PVPP lyophilisée

** PVPP 12 h à 60°C en étuve

**II. — COMPARAISON DE DEUX MODES DE SECHAGE DE LA PVPP APRES
SON ACTIVATION.**

La PVPP activée est utilisée à l'état sec afin de ne pas diluer l'échantillon dont on mesure l'activité laccase. Le procédé de séchage de la résine influe sur ses propriétés adsorbantes : la lyophilisation est préférable au séchage à l'étuve (12 h à 60°C) ; cependant la perte d'efficacité de la PVPP après ce dernier traitement n'est que de 15 p. 100.

III. — MODALITES DU CONTACT RESINE-ECHANTILLON.

Une dose de 0,8 g de PVPP est prêtassée dans une seringue de 10 ml (Didactic - Le Havre) obturée par du coton de verre. On obtient ainsi l'équivalent d'une cartouche. Un volume de 5 ml de moût y est déposé. Une percolation est réalisée et des fractions de 200 μ l sont recueillies en sortie de seringue après 1, 2, 3, 5, 10 et 20 minutes. On mesure l'activité laccase de ces aliquotes d'une part.

D'autre part, la même manipulation est réalisée à partir de PVPP utilisée en bain (dans un becher) dans les conditions décrites par DUBOURDIEU et *al.* en 1984. Les fractions prélevées aux mêmes intervalles de temps sont filtrées sur coton de verre avant leur dosage (figure 1).

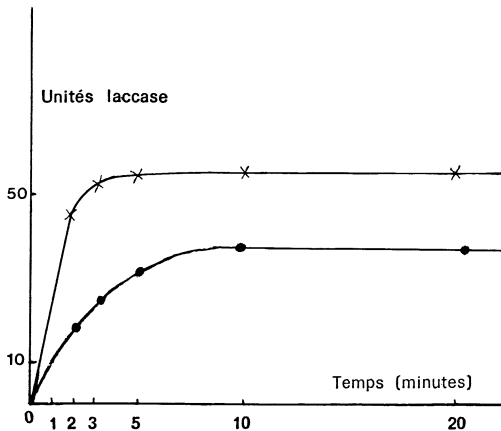


Fig. 1. — Optimisation du délai de contact échantillon-PVPP conditionnée en cartouche (+) ou en bain (.)

L'activité laccase est maximale dans l'échantillon qui a subi 2 à 3 minutes de contact avec la PVPP prêtassée en cartouche : ce temps correspond à l'imbibition de la résine.

L'activité n'atteint jamais la même valeur maximale, lorsque la PVPP est utilisée en bain. L'élimination des composés phénoliques est donc moins rapide et moins complète par ce dernier procédé.

Le gain de temps réalisé grâce au tassement de la PVPP dans la seringue est d'environ 7 minutes par échantillon, par rapport à la valeur donnée dans l'article initial.

Il est à noter cependant que le contact de l'échantillon avec la PVPP sèche entraîne une concentration de la laccase après l'imbibition de la poudre et ainsi un dosage par excès.

IV. — PREPARATION DE LA SYRINGALDAZINE.

1°) Essai d'un mélange préalable du tampon réactionnel et de la syringaldazine.

Il serait envisageable de préparer à l'avance le tampon réactionnel (acétate de sodium 0,1 M pH = 5) et le substrat (6 mg de syringaldazine soniquée dans 100 ml d'éthanol absolu).

La stabilité du mélange dans les proportions de 1,4 ml de tampon pour 0,6 ml de substrat a été testée en dosant un même moût après 0,1; 0,5; 1; 2 et 4 heures (figure 2).

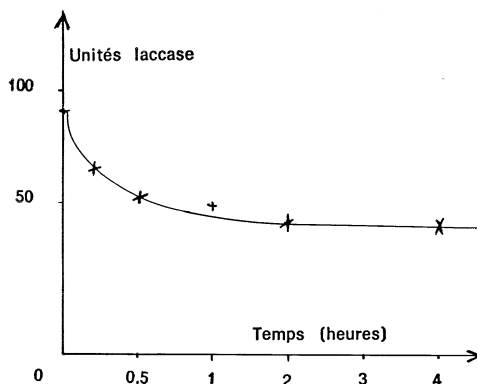


Fig. 2. — Variation du temps de contact syringaldazine - tampon réactionnel

La syringaldazine instable en milieu aqueux précipite à long terme dans le tampon réactionnel. Le mélange sera donc réalisé extemporanément au dosage.

2°) Comparaison entre la sonication et la dissolution de la syringaldazine dans l'éthanol absolu.

Deux suspensions de 6 mg de syringaldazine dans 100 ml d'éthanol absolu ont été d'une part soniquée pendant 5 minutes et d'autre part conservée à température ambiante sans traitement. Après 24 heures au repos, les deux solutions sont comparées : le résultat du dosage de la laccase d'un milieu de culture de *Botrytis* ne diffère pas pour les 2 préparations du substrat.

V. — LINEARITE DE LA REACTION D'OXYDATION DE LA SYRINGALDAZINE PAR LA LACCASE.

Pour les teneurs de 1 à 10 unités laccase par millilitre de moût, la vitesse de réaction exprimée comme la variation de la densité optique à 530 nm en fonction du temps est maximale et constante pendant 8 minutes (figure 3).

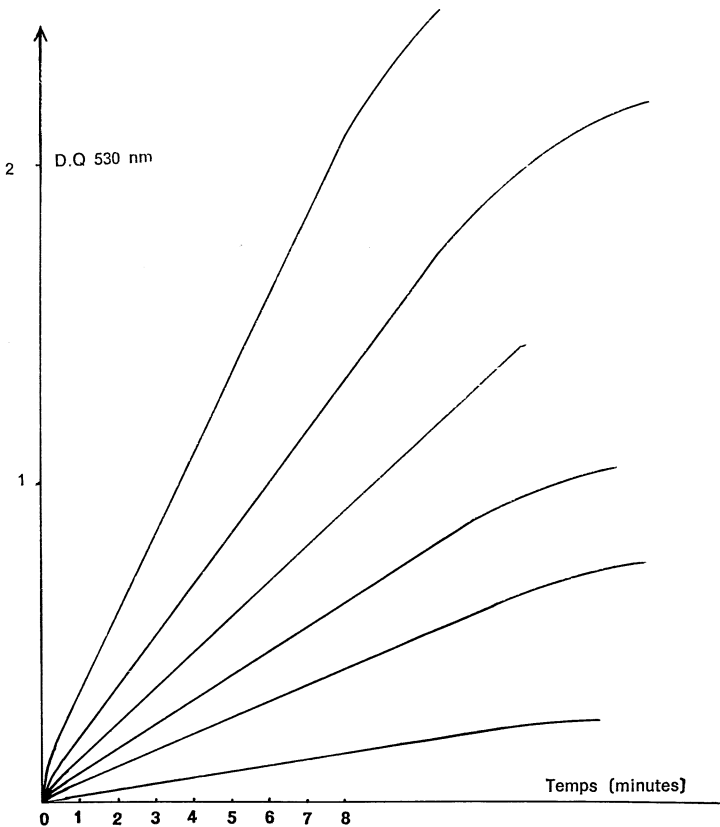


Fig. 3. — Linéarité de la réaction d'oxydation de la syringaldazine par la laccase.

L'enregistrement de cette vitesse et le calcul des unités laccase correspondantes devront être effectués pendant cet intervalle de temps dans la pratique.

VI. — REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE DE DOSAGE DE LA LACCASE A LA SYRINGALDAZINE.

Une série de 10 dosages complets a été réalisée selon les conditions optimales décrites et pour un même moût pourri.

Les résultats sont analysés statistiquement selon le test de Student-Fischer (Tableau II).

L'intervalle de confiance au seuil de 95 p. 100 est de 3,3 p. 100.

L'incertitude maximale à ce même seuil pour 1 mesure est de 10,5 p. 100 ; elle est acceptable pour les valeurs trouvées dans la pratique.

TABLEAU II

Reproductibilité de la méthode à la syringaldazine pour 10 dosages d'un même moût botrytisé

Coefficient de variation	4,6 %	Incertitude maximale au seuil de 95 %	
Valeur estimée de la variation de la moyenne	0,091	pour 4 mesures	5,2 %
Intervalle de confiance au seuil de 95 %	3,3 %	pour 3 mesures	6 %
		pour 2 mesures	7,4 %
		pour 1 mesure	10,5 %

CONCLUSION

Le choix de la PVPP, résine inerte vis à vis de la laccase, permet l'élimination des composés phénoliques du moût en quantité suffisante pour le dosage de l'activité laccase.

Son mode de séchage après activation est envisageable par simple passage à l'étuve : la lyophilisation n'est donc pas impérative, à condition d'affecter de plus 15 p. 100 la valeur du résultat du dosage obtenue par défaut.

Le temps de contact de la PVPP prêtassée en cartouche et de l'échantillon est réduit à 3 minutes par dosage. Ce gain de temps est considérable dans le cas d'analyses en série.

La sonication de la syringaldazine dans l'éthanol absolu n'est pas indispensable : il est rare, dans la pratique, de disposer d'un bac à ultra-sons. La dissolution lente du substrat à température ambiante est complète après 24 heures.

La réaction d'oxydation de la syringaldazine est linéaire pendant 8 minutes : cela permet d'observer une variation significative de la densité optique à 530 nm pour des valeurs inférieures à 1 unité laccase.

Enfin, les dosages réalisés systématiquement au chai ne seront pas répétés : l'incertitude maximale de 10 p. 100 sur une seule mesure est acceptable pour les valeurs d'unités laccase courantes.

Note reçue le 23 juin 1986.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

DUBOURDIEU D., GRASSIN C., DERUCHE C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Mise au point d'une mesure rapide de l'activité laccase dans les moûts et dans les vins par la méthode à la syringaldazine. Application à l'appréciation de l'état sanitaire des vendanges. *Connaissance Vigne et Vin*, **18**, n° 4, 237-252.