

RELATION ENTRE LE TAUX DE POURRITURE DE LA VENDANGE, L'ACTIVITE LACCASE ET L'APTITUDE A LA CASSE OXYDASIQUE DES MOUTS ET DES VINS (*)

R. CORDONNIER, J. HURTREL et C. BIRON

Station de Technologie Végétale
Centre de Recherches Agronomiques de Montpellier
Institut National de la Recherche Agronomique
34060 Montpellier Cedex (France)

INTRODUCTION

On connaît bien les conséquences du développement de *Botrytis cinerea* sur la baie de raisin. Celles-ci se traduisent par des effets qui peuvent être tout à fait dommageables vis-à-vis de la qualité des produits dans ses différentes composantes : couleur, flaveur, stabilité physicochimique, aptitude à la clarification notamment par filtration. Ces effets varient en particulier avec l'importance de la contamination du raisin par le champignon. On conçoit dès lors l'intérêt qu'il y aurait à posséder une méthode qui permette d'apprécier le taux de pourriture de la vendange et de relier celui-ci à la qualité.

Nous nous sommes fixés un tel objectif et avons tenté de voir si la laccase, secrétée spécifiquement par *Botrytis cinerea*, pouvait servir de critère quantitatif et qualitatif à l'envahissement du parasite.

Dans ce but nous avons étudié la relation entre d'une part le taux de pourriture de la vendange et l'activité laccase des moûts et d'autre part l'activité laccase des moûts et des vins et leur aptitude à la casse oxydasique.

MATERIELS ET METHODES

1. — Préparation des échantillons

— Les grains de raisins sains ou pourris destinés à l'appréciation de l'activité laccase sont écrasés dans un mortier et une partie du broyat centrifugée à 12000 g pendant 10 minutes. Les activités sont mesurées sur les jus obtenus, dilués avec du tampon acétate 0,1 N pH 4,0 à des taux variables suivant leur teneur en enzyme.

(*) Communication présentée aux Journées Internationales d'Etude du Groupe Polyphénols, 2-4 mai 1979 Logroño (Espagne).

— Les vins correspondants ont été vinifiés en rouge après égrappage à la main, foulage, sulfitage à 50 mg de SO_2 par litre et levurage à raison de 5×10^8 cellules de *Sacch. cerevisiae* par ml. Un échantillon de moût est au préalable prélevé pour analyse des activités enzymatiques. Après 8 jours de cuvage, les jus de presse et de goutte sont rassemblés et centrifugés. Ils sont analysés en général sans dilution (poids de raisin mis en œuvre : 2 kg).

2. — Mesures des activités polyphénoloxydasiques

Les activités sont déterminées par la mesure spectrophotométrique de l'apparition des produits colorés de la réaction dans les premières minutes qui suivent l'addition de l'enzyme au substrat à concentration saturante. Elles sont définies comme la pente à l'origine de la courbe des densités optiques en fonction du temps et exprimées en variation de densité optique par minute et par millilitre ($\Delta \text{DO}/\text{min}/\text{ml}$) de jus.

Deux types d'activités ont été retenus :

— *une activité laccase* (*p*-diphénol — O_2 oxydoréductase) absente du raisin sain et présente dans le raisin pourri, parasité par *Botrytis*. Elle est mesurée à pH 4,0 en présence de benzidine comme substrat, à la concentration de 2×10^{-3} M dans le mélange d'incubation.

— *une activité catécholoxydase (ou tyrosinase)* — (*o*-diphénol — O_2 oxydoréductase) présente à la fois dans le raisin et *Botrytis*. Elle est mesurée à pH 4,75 en présence de méthyl-4 pyrocatechol à la concentration de 10^{-2} M.

3. — Appréciation de l'aptitude à la casse oxydasique

Elle est déterminée sur le vin centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes et laissé au large contact de l'air (tenue à l'air) pendant 24 heures. La mesure des densités optiques à 520 nm et 420 nm sous 1 mm d'épaisseur, aux temps 0 et 24 h., permet de se rendre compte respectivement de la disparition des chromophores rouges et de l'apparition des chromophores jaunes, le rapport des densités optiques à 420 et 520 nm traduisant l'évolution des uns par rapport aux autres.

RESULTATS

1. — L'activité laccase, marqueur de la présence de *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin

Un bon marqueur doit répondre à trois conditions : *la spécificité* (absence dans la baie saine, présence dans la baie pourrie), *la solubilité* (sécrété par *Botrytis*, il ne doit pas rester fixé aux tissus du grain de raisin mais au contraire passer dans le jus au cours de l'extraction), *la stabilité* (ou tout au moins une durée de vie suffisante pour qu'il puisse être dosé de façon significative après les diverses manipulations auxquelles la vendange peut être soumise).

L'activité laccase répond à ces trois conditions :

— *Botrytis cinerea* secrète une *p*-diphénol — O₂ oxydoréductase (1.10. 3. 2.) ou laccase alors que la polyphénoloxydase du raisin est une *o*-diphénol—O₂ oxydoréductase (1. 10. 3. 1). Il s'ensuit que de nombreux substrats de la laccase secrétée par *Botrytis* ne sont pas attaqués par l'enzyme du raisin (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON, 1973). Parmi eux, nous avons choisi la benzidine qui présente une affinité pour l'enzyme particulièrement élevée par rapport aux autres substrats testés. De plus, ce substrat, par rapport à l'amino 4 N-N diméthyl *p*-phénylène diamine proposée par DUBERNET (1974), offre l'avantage d'être stable à l'autoxydation.

L'activité laccase, sur la quinzaine de cépages que nous avons testés, est bien absente du raisin sain et présente dans la baie pourrie. Elle permet donc d'apprécier spécifiquement les activités polyphénoloxydasiques qui sont le fait d'une contamination par *Botrytis cinerea*.

— L'activité laccase, mesurée avec la benzidine, est soluble. Nous l'avons vérifié en comparant par la méthode polarographique les activités de broyats de raisin et des jus correspondants centrifugés à différentes vitesses. En cela encore, l'enzyme de *Botrytis* diffère de l'enzyme du raisin dont la majeure partie est liée aux éléments solides de la baie.

— L'activité laccase est très stable dans les moûts issus de vendanges pourries comme le montrent les résultats du tableau I.

TABLEAU I

Evolution des activités laccase et tyrosinase au cours de la conservation du jus issu de vendange pourrie

(Activité exprimée en Δ DO/min/ml de jus)

Temps de conservation (h.)	<i>Terret</i>		<i>Gamay</i>		<i>Aramon</i>		<i>Aubun</i>	
	Activité laccase	Activité tyrosinase	Activité laccase	Activité tyrosinase	Activité laccase	Activité tyrosinase	Activité laccase	Activité tyrosinase
0	320	275	185	265	60	240	215	205
4	575	208	120	245	60	75	445	95
8	385	150	110	205	60	22	445	75
24	385	120	225	42	75	15	535	40
48	370		220		72		525	

Les raisins sont broyés et les jus extraits par centrifugation à 7000 g pendant 10 minutes. Les activités sont mesurées sur les jus aussitôt après extraction et à différents temps de conservation. Les nombres en gras correspondent aux activités au moment de la casse oxydasique.

D'une façon générale, on observe au moment même de la casse oxydative une augmentation d'activité laccase (cette augmentation d'activité paraît être cependant un artefact du dosage spectrophotométrique car on ne l'observe pas par dosage polarographique).

Dans le même temps les activités tyrosinase — qui sont le fait de l'enzyme de *Botrytis* et aussi de l'enzyme du raisin — diminuent fortement, ce qui démontre la très grande fragilité de cette dernière.

2. — Relation entre le taux de pourriture de la vendange et l'activité laccase des moûts

— *Activité laccase et développement de Botrytis sur le raisin.* (Tableau II). Les activités laccase apparaissent très tôt, avant même l'apparition des conidiophores alors que la baie semble saine à un examen visuel superficiel.

TABLEAU II

Evolution des activités laccase dans le jus au cours du développement de *Botrytis* sur la baie de raisin

(Activité exprimée en Δ DO/min/ml de jus)

Etat visuel du raisin var. <i>Italia</i> *	Poids de 100 grains (g)	Perte de poids (p. 100)	Activité des jus correspondants	
			Activité laccase	Activité tyrosinase
« Sain »	540	0	4	130
Pellicules mortifiées brunies	560	0	60	150
Pourri « gras ». Pellicules partiellement envahies de conidiophores	500	9,3	300	140
Pourri « gras ». Pellicules totalement envahies de conidiophores	413	23,5	625	150
Pourri « sec ». Pellicules envahies de conidiophores	233	56,8	1200	220

* Lots de raisins échantillonnés sur un ensemble de grappes d'un cépage à peau très épaisse, l'*Italia*, prélevées en fin de vendange de façon à avoir en une fois les différents stades de pourriture recherchés.

Elles augmentent ensuite jusqu'à l'envahissement complet par les conidiophores. La production d'enzyme paraît alors s'arrêter et l'enrichissement observé correspondre au facteur de concentration due à l'évaporation du jus consécutive à une période de sécheresse.

Les activités tyrosinase ne suivent pas la même progression, ce qui démontre la grande fragilité de la part d'activité revenant à l'enzyme du raisin.

La très forte activité laccase du « pourri sec » apporte au contraire la preuve de la grande stabilité de la laccase dans le raisin.

— *Activité laccase de raisins pourris de différents cépages*

Nous avons comparé l'activité laccase de raisins à des taux de pourriture visuellement équivalents et correspondant à du « pourri plein ».

TABLEAU III

Activité laccase (Δ DO/min/ml de jus) de raisins pourris « pleins »

	Activité laccase	Poids de 100 grains (g)		Perte de poids (p. 100)
		Sains	Pourris	
<i>Grenache gris</i>	575	187	75	60,0
<i>Terret</i>	1125	265	119	55,1
<i>Aramon</i>	325	310	142	54,2
<i>Chardonnay</i>	450	150	77	48,7
<i>Grenache noir 1</i>	180	220	115	47,8
<i>Italia 1</i>	475	532	372	30,0
<i>Aubun</i>	2900	245	80	26,5
<i>Muscat d'Alexandrie</i>	565	332	250	24,7
<i>Chasselas</i>	1100	148	116	21,6
<i>Italia 2</i>	1200			
<i>Sémillon</i>	860			
<i>Carignan</i>	425			
<i>Grenache noir 2</i>	310			
<i>Cinsault</i>	250			

Ces activités varient dans de larges proportions (de 1 à 10) suivant les échantillons. Par ailleurs, il n'y a pas de relation entre ces activités et la perte de poids des raisins correspondants. C'est ainsi que certains échantillons (*Aubun*, *Chasselas*) n'ayant perdu que le quart de leur poids ont cependant des activités deux à quatre fois supérieures à celles d'échantillons ayant perdu plus de la moitié de leur poids (*Grenache gris*, *Aramon*).

On doit remarquer aussi que pour un même cépage les activités peuvent varier du simple au double (*Grenache 1* et *2*, *Italia 1* et *2*) à taux de pourriture apparemment équivalents.

Il y a donc des facteurs de variations indépendants du taux de concentration et du cépage qui nous échappent. Nous en connaissons cependant déjà certains, à savoir l'importance de la souche de *Botrytis* et la composition du milieu sur lequel croît le champignon (KOVAC, 1975 ; SAPIS, 1978)

Quoiqu'il en soit, ces facteurs de variations rendent aléatoire toute recherche de relation entre les activités laccase d'une vendange et son taux de contamination par *Botrytis*. Par ailleurs, il ressort de ces résultats que l'appréciation visuelle du degré d'atteinte d'une vendange est bien difficile et tout à fait insuffisante pour traduire ses effets quant à la perte de récolte en poids et quant à la perte de qualité, en termes tout au moins d'activité laccase. Par exemple, ce n'est pas forcément le pourri « sec » qui est plus actif que le pourri « gras ».

— *Activité laccase et taux de pourriture*

TABLEAU IV

Relation entre le taux de pourriture et l'activité laccase du raisin
(Activité exprimée en Δ DO/min/ml de jus)

Pourcentage de grains pourris	<i>Carignan</i> (*)	<i>Cinsault</i>	<i>Grenache</i>	<i>Aramon</i>
0 (Témoin)	0	Traces	5	Traces
5	10 — 17			
10	20 — 27			
12,5		20	50	20
20	50 — 55			
25		40	60	35
30	70 — 82			
40	90 — 112			
50	145 — 157	65	80	85
100		250	310	320

(*) Fourchette d'activité sur plusieurs expériences.

Les résultats du tableau IV rendent compte des essais. Pour un même cépage et en triant avec beaucoup de soin des raisins sains, on a remarqué une assez bonne proportionnalité entre le pourcentage de grains pourris et l'activité laccase des jus correspondants jusqu'à 40 p. 100 de grains pourris. Au-delà, l'augmentation d'activité est plus forte (tableau IV, colonne 1). Dans les essais suivants (colonne 2, 3 et 4) il existe bien une relation entre l'activité laccase et le taux de pourriture mais sans proportionnalité. Il apparaît donc bien difficile de relier l'état sanitaire de la vendange à l'activité laccase. Nous avons dès lors essayé de voir s'il était possible de relier l'activité laccase d'une vendange à sa qualité technologique en prenant pour critère l'aptitude du vin correspondant à la casse oxydasique ou tout au moins son aptitude à l'oxydation.

3. — Relation entre l'activité laccase des moûts et des vins et leur aptitude à la casse oxydasique

Des lots de raisins de différents cépages, ajustés à différents taux de pourriture par addition de baies pourries, ont été vinifiés en rouge et les moûts et les vins analysés du point de vue activité laccase et aptitude à la casse oxydasique ou à l'oxydation dans les conditions définies au chapitre matériels et méthodes (Tableau V).

— Evolution de l'activité laccase du moût au vin

Du moût au vin, l'activité laccase diminue dans des proportions le plus souvent importantes mais aussi très variables (de 40 à 98 p. 100 dans les essais décrits). Il s'ensuit qu'en partant d'activités sensiblement identiques dans les moûts, on peut retrouver dans les vins des activités variant d'un facteur cinquante comme le montrent les résultats ci-après extraits du tableau V.

Cépage	Activité laccase (Δ DO/mn/ml)		Tenue à l'air
	Dans le moût	Dans le vin	
<i>Carignan</i>	75	1	Tendance à l'oxydation
<i>Aramon</i>	85	34	Forte casse après 4 h.
<i>Grenache</i>	80	49	Très forte casse après 4 h.
<i>Cinsault</i>	65	34	Très forte casse

Par suite de ces variations importantes d'activité laccase au cours de la vinification, il n'y a pas non plus toujours de relation entre les activités des moûts et l'aptitude à la casse des vins correspondants.

Les causes de ces variations nous échappent. Il serait intéressant de les préciser et notamment de déterminer la responsabilité éventuelle du cépage.

— Relation entre l'activité laccase des vins et leur aptitude à la casse

Les résultats du tableau V montrent aussi une relation entre l'activité laccase des vins et leur aptitude à la casse. Il suffit cependant de très faibles activités pour induire une casse oxydasique ou une oxydation, comme l'indique l'augmentation du rapport DO 420/DO 520 qui traduit une dégradation des chromophores rouges et (ou) une formation de chromophores jaunes.

Cette relation n'est cependant pas toujours vérifiée. Certains vins, pauvres en activités, sont néanmoins sensibles à la casse ; d'autres au contraire, sont résistants bien que riches en activités. Les résultats relatifs aux vins *d'Italia* fournissent un bon exemple de vins ne cassant pas pour de très fortes activités. La laccase n'est donc pas le seul facteur limitant de la casse et de l'oxydation qui la précède.

TABLEAU V

Evolution de l'activité laccase du moût au vin
Relation avec l'aptitude à la casse oxydasique

Cépages	Activité laccase (Δ DO/min/ml)			Valeurs de la teinte (DO 420/DO 520) aux temps 0 et 24 h.	Stabilité de la coloration du vin après 24 h (test de tenue à l'air)
	Dans le moût avant sulfitage	Dans le vin	Perte d'activité (p. 100)		
<i>Carignan</i> sain	Traces	0		0,36 — 0,37	Bonne
25 p. 100 pourri	75	1	98	0,43 — 0,63	Tendance à l'oxydation
50 p. 100 »	155	5	96	0,60 — 2,5	Casse } peu active,
100 p. 100 »	425	12	97	1,6 — 2,5	Casse } seulement après 24 h.
<i>Aramon</i> sain	35	0		0,54 — 0,42	Bonne
25 p. 100 pourri	85	12	65	0,61 — 1,90	Forte casse après 12 h.
50 p. 100 »	50	34	60	0,94 — 2,4	Forte casse après 4 h.
100 p. 100 »	320	58	81	1,3 — 2,5	Casse initiale avant examen
<i>Grenache</i> sain		0		0,42 — 0,44	Bonne
12,5 p. 100 pourri		4	92	0,41 — 1,5	Forte casse
25 p. 100 »	60	9	85	0,45 — 2,2	Très forte casse
50 p. 100 »	80	49	38	0,61 — 2,7	Très forte casse
100 p. 100 »	310	145	53	1,63 — 2,6	Très forte casse } après 4 h.
<i>Cinsault</i> sain	Traces	0		0,37 — 0,60	Bonne
12,5 p. 100 pourri	20	0	100	0,7 — 0,6	Légère oxydation
25 p. 100 »		10	75	0,5 — 1,2	Forte casse
100 p. 100 »	65	34	47	1,7 — 1,8	Très forte casse
50 p. 100 »	250	64	74	0,9 — 2,0	Très forte casse
<i>Italia</i> sain	4	0			Bonne
pellicules mortifiées	60	10	83		Casse importante
Pourri plein, gras	625	83	86		Forte oxydation } sans
Pourri plein, sec	1200	340	71		Forte oxydation } casse
<i>Carignan</i>		4			Bonne
<i>Syrah</i>		3			Bonne
<i>Cabernet-Sauvignon</i>		14			Casse peu active

Sans doute la nature du substrat et sa concentration dans le milieu ont-ils une importance qu'il serait intéressant de préciser. Cette observation pose le problème de l'intervention du cépage dans l'aptitude des vins à la casse oxydasique.

Il résulte de l'ensemble de ces résultats que l'activité laccase d'un moût est un critère très incertain pour chiffrer — ou même donner une indication — sur la proportion de pourriture d'une vendange.

L'activité laccase du moût et parfois du vin est aussi un moyen bien incertain de mesurer les effets de la pourriture. Sur ce dernier point cependant il serait intéressant de compléter nos observations expérimentales par une enquête étendue au plus grand nombre de cas correspondants à la réalité de la pratique des caves.

Par ailleurs ces résultats ont montré l'intérêt qu'il y aurait à préciser les facteurs biologiques, autres que *Botrytis cinerea*, de l'aptitude des vins à la casse oxydasique et parmi eux la nature et la concentration en substrats polyphénoliques du raisin et donc le cépage.

Manuscrit reçu le 18 octobre 1979.

RESUMÉ

L'objet du travail décrit était de voir s'il pouvait être établi une relation entre le taux de pourriture de la vendange, l'activité laccase et l'aptitude à la casse oxydasique des moûts et des vins. L'activité laccase d'un moût est un critère très incertain pour chiffrer la proportion de pourriture d'une vendange ou pour donner une indication sur l'aptitude à la casse oxydasique du vin correspondant à cette vendange. Il est apparu en effet que l'aptitude à la casse oxydasique dépendait aussi d'autres facteurs biochimiques que la laccase. Parmi eux, sont évoqués la nature et la concentration en substrat phénolique du raisin qu'il serait intéressant de préciser en fonction des cépages.

SUMMARY

In this work, a potential relation between rotten grapes level, laccase activity and tendency to oxidation of musts and wines is studied. Laccase activity of a must keeps uncertain to determine the level of rotten grapes as to give an indication about capacity of oxidation of correspondent wines. Oxidation is in connection with other biochemical factors such as type and level of grape phenolics and varieties.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszustellen ob es ein Verhältnis gibt zwischen dem Fäulnisgehalt des Lesegutes, der Laccaseaktivität und der braunen Bruchfähigkeit in Most und Wein.

Die Laccaseaktivität eines Mostes ist ein unsicherer Wertmesser, um den Fäulnisgehalt zu bestimmen oder um eine Angabe zu machen, ob der Wein dieses Lesegutes bruchstabil ist oder nicht. Es wurde bewiesen, daß die Bruchstabilität

auch noch von anderen biochemischen Faktoren abhängig ist als nur von der Laccase. Bei diesen wäre die Art und Konzentration an phenolischen Substraten der Traube in Abhängigkeit von der Traubensorte interessant näher bestimmt zu werden.

RESUMEN

El objeto de este trabajo fué ver si se podía establecer una relación entre la cantidad de podredumbre de la vendimia, la actividad de lacasa y la propensión a la quiebra oxidásica de los mostos y los vinos.

La actividad de lacasa de un mosto es un criterio inseguro para cifrar la proporción de podredumbre de una vendimia o para dar una indicación de la predisposición a la quiebra oxidásica del vino procedente de dicha vendimia. Se ve que, en efecto, la propensión a la quiebra oxidásica depende además de otros factores bioquímicos que la lacasa. Entre éstos, figuran la naturaleza y cantidad de substrato polifenólico de la uva, lo que sería interesante precisar en función de los vidueños.

RIASSUNTO

Lo scopo del lavoro descritto, era di vedere se si poteva fare una relazione tra il percentuale di marciume della vendemmia, l'attività laccase e la disposizione alla casse ossidasica dei mosti e dei vini.

L'attività laccase d'un mosto è un criterio molto incerto per valutare la proporzione di marciume d'una vendemmia o per dare un'indicazione sulla disposizione del vino che corrisponde a questa vendemmia.

Difatti, abbiamo visto che la disposizione alla casse ossidasica, dipendeva anche d'altri fattori biochimici che la laccase. Tra loro, sono messi in rilievo, la natura et la concentrazione in sistrati fenolici dell'uva che sarebbe interessante di precisare secondo i vitigni.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DUBERNET M. et RIBÉREAU-GAYON P., 1973. Les polyphénoloxydases du raisin sain et du raisin parasité par *Botrytis cinerea*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **277**, Série D, 975-978.
- DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. *Thèse Doctorat 3^e Cycle*, Université de Bordeaux II.
- KOVAC̄ V.M., 1975. Contribution à l'étude des oxydases dans la technologie du vin. *Thèse Doctorat*, Université de Novi sad (Yougoslavie).
- SAPIS J.C., 1978. Modifications du raisin parasité par *Botrytis cinerea*. Incidence sur la composition des moûts. *Ann. Technol. Agric.*, **27**, (I), 137-139.