Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1991, **25**, N° 2, 111-115

INFLUENCE DES SUCRES SUR LA LACCASE DE *BOTRYTIS CINEREA* DANS LE CAS DE LA POURRITURE NOBLE DU RAISIN

B. DONECHE

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

INTRODUCTION

Une des principales conséquences du développement du champignon *Botrytis cinerea* sur le raisin est l'altération des composés phénoliques par une *p* - diphénol : oxygène oxydoréductase, communément appelée laccase (EC 1.10.3.2). Dans le cas de raisins atteints de pourriture grise, la gravité des phénomènes oxydatifs rend difficile la vinification (RIBÉREAU-GAYON, 1982). Inversement, ces difficultés technologiques sont moins importantes avec des raisins blancs de pourriture noble qui sont pourtant riches en laccase.

De nombreux travaux ont montré que, lorsque *B. cinerea* sécrète la laccase dans un milieu de culture, la nature et les propriétés des isoenzymes produits dépendent des inducteurs phénoliques présents dans le milieu (MARBACH et *al.*, 1983 et 1984). La production de cette enzyme est également liée au processus de pathogénèse (MAYER ET HAREL, 1979); les résidus pectiques provenant de l'action des enzymes fongiques sur les parois cellulaires du raisin agissent comme second inducteur de la synthèse de laccase (MARBACH et *al.*, 1985).

Les cépages blancs sont moins sensibles à l'action de la laccase que les cépages rouges (FREGONI et *al.*, 1986; CORDONIER, 1987). Ils renferment cependant des substances phénoliques utilisées comme substrat par la laccase (GUNATA et al., 1987). Même si la couleur des vins blancs liquoreux, issus de raisins pourris nobles , ne dépend que partiellement de leur contenu phénolique (VOYATZIS, 1984), certaines substances comme les dérivés de l'acide hydroxycinnamique sont susceptibles de provoquer le brunissement du vin en présence de laccase (SALGUES et *al.*, 1986).

Une différence importante entre la pourriture noble et la pourriture grise réside dans l'intensité du phénomène de concentration résultant de la déshydratation de la baie de raisin (DONECHE, 1987). Ainsi les raisins pourris nobles parvenus au stade « confit » peuvent pré-

senter des teneurs en sucres voisines de 350 g/l alors que celles-ci dépassent rarement 220 g/l dans le cas de raisins atteints de pourriture grise. L'influence de ce paramètre n'avait jamais été étudié et il nous a paru intéressant de rechercher si les sucres pouvaient avoir une action sur l'activité laccase de *B. cinerea*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons disposé pour cette étude de raisins blancs de cépage Sémillon prélevés dans le vignoble de Sauternes (France). Les raisins ont été séparés en plusieurs stades d'évolution de la pourriture selon la classification suivante :

stade 1 - baies saines,
stade 2 - baies tachetées (taches de diamètre inférieur à 5 mm),
stade 3 - baies tachées (taches de diamètre supérieur à 5 mm),
stade 4 - baies entièrement tachées, « pourries pleines »,
stade 5 - apparition d'hyphes mycéliens à la surface de la baie,
stade 6 - baies desséchées, « pourries rôties ».

Les raisins sont congelés puis broyés dans un tampon acétate 0,1 M pH 5,0 contenant un agent antioxydant (acide ascorbique 5 mM). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 22.000 g pendant 10 minutes. Les protéines sont précipitées par addition de polyéthylèneglycol 4.000 (71 p. cent poids/volume) et recueillies par centrifugation à 30 .000 g pendant 20 minutes. Le culot protéique est dissous dans le minimum de volume de tampon acétate 0,1 M pH 3,4 pour une meilleure stabilité de la laccase. Le résidu insoluble est éliminé par centrifugation à 22.000 g pendant 20 minutes. L'ensemble des opérations est réalisé à la température de 4°C. L'extrait partiellement purifié ainsi obtenu est utilisé pour la détermination de l'activité laccase. Celle-ci est mesurée par la variation de densité optique à 530 nm résultant de l'oxydation du substrat syringaldazine dans le milieu réactionnel suivant : tampon acétate 0,1 M pH 5,0 contenant 0,05 mM de syringaldazine. Les résultats représentent la moyenne statistique d'au moins trois répétitions.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les sucres ont une influence indirecte sur la production de l'enzyme. Les résultats regroupés dans le tableau montrent que l'activité laccase augmente progressivement au cours du développement de la pourriture pour atteindre un maximum au stade 4 « pourri plein ». Au stade 6 « pourri rôti «, l'activité par baie est plus faible. La concentration résultant de la déshydratation de la baie, comme l'indique l'évolution de la teneur en sucres, entraîne une forte augmentation de la pression osmotique interne des cellules du raisin. Dans ces conditions défavorables, l'activité métabolique du champignon est très réduite et il n'assure plus de façon suffisante le renouvellement des molécules protéiques. Cette diminution est beaucoup plus marquée si l'on considère l'activité laccase spécifique par mg de protéine. Le

champignon synthétise moins de laccase par rapport aux autres protéines. En effet, cette enzyme intervenant dans le processus de pathogénèse lui est d'une moindre utilité en fin de développement de la pourriture.

TABLEAU

Evolution moyenne de l'activité laccase au cours du développement de *Botrytis cinerea* sur le raisin

Stade d'infection	Concentration en sucres (g/l)	Activité laccase µU/baie	Activité laccase spécifique (mU/mg de protéines)
1	218	0	0
2	220	9,4	0,04
3	223	57,8	0,19
4	256	106,3	0,73
5	278	75,1	0,51
6	357	39,1	0,28

L'étude cinétique montre que les sucres exercent de plus une action directe sur l'activité laccase. La technique classique consiste à déterminer l'activité enzymatique en présence de concentrations croissantes en substrat et en substance susceptible d'interférer. La représentation des résultats en doubles inverses (vitesse de réaction et concentration en substrat) donne une série de droites correspondant aux différentes concentrations en substance interférente. La disposition de ces droites renseigne sur la nature de l'interférence. Ainsi la mesure de l'activité laccase en présence de concentrations croissantes en sucres (mélange équimolaire de glucose et de fructose) conduit à une série de droites parallèles (figure). Ceci traduit un phénomène d'**inhibition incompétitive** de la part des sucres. Ce type d'inhibition est très courant dans le cas de réactions enzymatiques à deux substrats comme celle catalysée par la laccase :

réaction 1

syringaldazine + laccase oxydée $\rightleftharpoons$ syringaldazine oxydée + laccase réduite

réaction 2

laccase réduite + 1/2 0_2 $\rightleftharpoons$ laccase oxydée + H_2O

Le sucre ne se combine pas à l'enzyme libre (laccase oxydée) mais il se fixe sur l'enzyme substituée de façon covalente (laccase réduite) pour donner un complexe qui ne peut plus fournir les produits normaux de la deuxième réaction : laccase oxydée et eau. Cette inhibition porte vraisemblablement sur le cuivre, site d'oxydo-réduction de la laccase. Elle augmente avec la concentration de l'inhibiteur, c'est-à-dire avec la richesse en sucres du milieu. La constante apparente d'inhibition est Ki : 0,89 M.

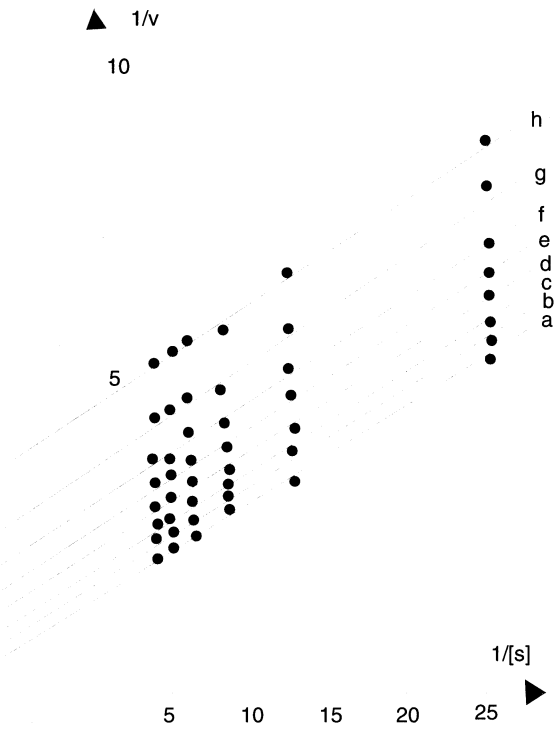


Fig. - Influence de la concentration en sucres du milieu sur l'activité laccase de *Botrytis cinerea*

v : vitesse de réaction (mU)
s : concentration en syringaldazine (10 - 5 M)
a: témoin; b: sucres 50g/l; c: sucres 100g/l; d: sucres 150 g/l; e: sucres 200g/l; f:sucres 250 g/l; g: sucres 300 g/l; h: sucres 350 g/l.

Il est important de souligner que, dans cette réaction à deux substrats, le degré d'inhibition augmente lorsque la concentration en substrats augmente. En d'autres termes, les sucres seront d'autant plus inhibiteurs que les concentrations en composés phénoliques et en oxygène seront plus grandes. La quantité de composés phénoliques dépendra de nombreux facteurs (développement du champignon, manipulation de la vendange et macération des parties solides). Concernant l'oxygène, l'augmentation de la richesse en sucres du moût limitera sa dissolution. Ainsi; en présence de 350 g/l de sucres, le taux de saturation de l'oxygène dans l'eau à 24°C n'est que de 5,2 mg/l. Dans un jus de raisin sain, la quantité d'oxygène susceptible de se dissoudre est supérieure à 8 mg/l; avec un jus issu de raisins « pourris rôtis », le taux de saturation en oxygène dépasse rarement 6 mg/l.

CONCLUSION

Le développement de *B. cinerea* sur le raisin entraîne une diminution importante de la quantité de composés phénoliques, soit par des phénomènes oxydatifs dûs à la laccase, soit par une dégradation en molécules simples assimilables par le champignon. Malgré leur faible teneur, les composés phénoliques vont contribuer à la couleur des vins blancs liquoreux.

En absence d'étude systématique de l'effet de *B. cinerea* et de la laccase sur la couleur des vins blancs, il est possible de considérer que les moûts issus de raisins « pourris nobles » présenteront une sensibilité moindre aux phénomènes oxydatifs. L'activité laccase dans ces baies desséchées est faible et son activité sera réduite par la grande richesse en sucres. Mais on ne peut pas négliger totalement les risques d'oxydation et la robe caractéristique de ces vins blancs liquoreux résulte vraisemblablement pour une grande partie de l'activité, régulée par les conditions du milieu, de la laccase de *B. cinerea*.

Note reçue le 10 Juillet 1991.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CORDONNIER R., 1987. Les effets de *Botrytis cinerea* sur la couleur et sur l'arôme. *Rev. Fr. Œnol.*, **108**, 21-29.

DONECHE B., 1987. Etude biochimique de la relation hôte-parasite dans le cas du raisin et de *Botrytis cinerea*. *Thèse Doctorat ès Sciences*, Université de Bordeaux II.

FREGONI M., IACONO F. et ZAMBONI M., 1986. Influence du *Botrytis cinerea* sur les caractères physicochimiques du raisin. *Bull. OIV*, 667-668, 995-1013.

GUNATA Y., SAPIS J.C. et MOUTONET M., 1987. Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenoloxidases. *Phytochem.*, **26**, n°6, 1573-1575.

MARBACH I., HAREL E. et MAYER A.M., 1983. Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*, *Phytochem.*, **22**, n°7, 1535-1538.

MARBACH I., HAREL E. et MAYER A.M., 1984. Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochem.*, **23**, n°12, 2713-2717.

MARBACH I., HAREL E. et MAYER A.M., 1985. Pectin, a second inducer for laccase production by *Botrytis cinerea*. *Phytochem.*, **24**, n°11, 2559-2561.

MAYER A.M. et HAREL E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.*, **18**, 193-215

RIBEREAU-GAYON P., 1982. Incidences œnologiques de la pourriture du raisin. *Bull. OEPP*, **12**, n°2, 201-214.

SALGUES M., CHEYNIER V., GUNATA Y. et WYLDE R., 1986. Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance ; 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *J. Food Sci.*, **51**, n°5, 1191-1194.

VOYATZIS I., 1984. Recherches sur les composés phénoliques des vins blancs. Interprétation de la couleur. *Thèse Doctorat en Œnologie - Ampélologie.* Université de Bordeaux II.