Connaissance Vigne Vin, 1984, **18**, N° 4, 237-252

MISE AU POINT D'UNE MESURE RAPIDE DE L'ACTIVITE LACCASE DANS LES MOUTS ET DANS LES VINS PAR LA METHODE A LA SYRINGALDAZINE. APPLICATION A L'APPRECIATION DE L'ETAT SANITAIRE DES VENDANGES.

D. DUBOURDIEU, Catherine GRASSIN*, Catherine DERUCHE et P. RIBÉREAU-GAYON,

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cédex (France).
* Stagiaire de recherches SOPRA 8, avenue de Réaumur BP 208, 92142 Clamart Cedex.

INTRODUCTION

L'état sanitaire de la vendange, en particulier le niveau de contamination des raisins par *Botrytis cinerea* constitue un critère déterminant dans l'appréciation de la qualité de la matière première en vinification.

Malgré le progrès des connaissances biochimiques acquises sur le métabolisme de *Botrytis* depuis une dizaine d'années, aucune méthode analytique d'appréciation de l'état sanitaire de la vendange n'est à ce jour couramment utilisée dans la pratique ; la notation visuelle du pourcentage de baies pourries, par rapport au nombre total de baies, demeure, en dépit de ses insuffisances, la seule référence des praticiens.

La mesure, dans le jus, d'une activité enzymatique exo-cellulaire de *Botrytis cinerea,* caractéristique du développement de ce champignon dans le raisin et absente dans les baies saines, constitue une possibilité d'apprécier l'état de contamination d'une vendange.

A priori, la laccase de *Botrytis cinerea* (E.C. 1.10.3.2.), décrite pour la première fois par DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON (1973), satisfait à ces conditions ; responsable de la casse oxydasique des vins rouges, elle diffère par ses propriétés de la tyrosinase (E.C. 1.10.3.1), polyphénoloxydase du raisin sain. DUBERNET (1974) exprime les deux activités oxydases par une vitesse de consommation d'oxygène, mesurée par méthode polarographique.

Cependant, la présence possible de ces deux enzymes dans les moûts frais impose, pour le dosage de la seule activité laccase, soit l'utilisation d'un substrat spécifique, soit la mise en œuvre d'un inhibiteur spécifique de la tyrosinase.

La mise au point d'un test simple de détermination de l'activité laccase, basé sur ces principes, a déjà suscité plusieurs travaux.

Une méthode colorimétrique utilisant l'amino-4 N,N-diméthylaniline dihydrochloride, substrat spécifique de la laccase, est décrite par DUBERNET (1974). Mais ce réactif est d'un emploi difficile à cause de sa sensibilité à l'oxydation chimique.

CORDONNIER et *al.* (1979) dosent l'activité laccase sur des jus bruts par colorimétrie en présence d'un autre réactif spécifique, la benzidine, stable à l'oxydation chimique. D'après les auteurs, l'activité laccase ainsi mesurée, manifeste des variations, selon le cépage et le stade de pourriture ; mais il semble qu'il existe aussi d'autres facteurs de variations inhérents à la méthode de dosage.

KOVAC (1979), recherchant l'activité laccase des milieux de culture, emploie également une méthode colorimétrique dont le substrat est le diméthoxy 2,6-phénol.

Plus récemment, un appareil de détermination de l'activité laccase (technolyseur 2000) a été proposé par E.N.S.A.M.-T.D.F. (SALGUES et *al.*, 1983) ; il est basé sur la mesure polarographique de la consommation d'oxygène d'un échantillon de moût brut, après addition d'un réactif ; sa nature exacte n'est pas connue, mais on sait qu'il contient un substrat phénolique et un inhibiteur spécifique de la tyrosinase du raisin.

Le procédé de dosage de l'activité laccase dans les moûts et les vins, proposé dans ce travail, utilise comme substrat spécifique la syringaldazine. HARKIN et OBST (1974) ont démontré la spécificité de ce substrat vis-à-vis de la laccase et décrit une méthode de détection qualitative de cette activité dans les tissus ligneux contaminés par des champignons. LEONOWICZ et GRZYWNOWICZ (1980) ont adapté le test à une détermination quantitative de l'activité laccase chez différents champignons. Cette méthode de mesure d'activité laccase n'avait jamais été appliquée en œnologie.

MATERIELS ET METHODES

I — MILIEUX ETUDIES

L'activité laccase a été mesurée à partir :

— de raisins botrytisés prélevés à la cueillette,

— de jus à la réception de la vendange,

— de vins rouges nouveaux,

— d'un milieu de culture de *Botrytis cinerea.*

a) Les raisins issus de cépages blancs ou rouges, prélevés dans différents vignobles du Bordelais, ont été pressés manuellement au laboratoire. La laccase, entièrement soluble, est dosée à partir de ces jus.

Pour les vendanges blanches botrytisées destinées à la production de vins liquoreux (pourriture noble), on distingue deux stades, le pourri plein (PP) et le pourri rôti (PR), correspondant respectivement au début et à la fin de la surmaturation.

Pour les cépages rouges, on distingue habituellement trois stades :

— la pourriture interne (PI) correspondant à une infection non décelable visuellement ; cependant les pellicules colonisées par le champignon se délitent et semblent ne plus adhérer à la pulpe ;

— le bourrelet de conidiophores (BC) lié au début de la sporulation ;

— le pourri flétri (PF) caractérisé par la généralisation des conidiophores sur toute la surface de la baie et son dessèchement.

b) Une appréciation globale de l'état sanitaire des vendanges est effectuée à leur réception. On considère arbitrairement trois classes : raisins sains, raisins faiblement contaminés (pourcentage de baies botrytisées inférieur à 10 p. 100) et raisins contaminés.

c) Les échantillons de vins rouges nouveaux sont prélevés avant sulfitage. Si les échantillons contiennent du SO_2 libre, il convient d'ajouter un excès d'éthanal (1 ml à 5 p. 100 pour 250 ml d'échantillon).

d) Enfin *Botrytis cinerea* est cultivé sur milieu CZAPEK modifié (DUBOURDIEU, 1982) contenant du glucose (50 g/l) et de l'acide tartrique (5 g/l), seules sources de carbone organique. Les mesures de l'activité laccase sont effectuées à partir d'une culture de 5 semaines.

II — PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de moûts ou de vins subissent un traitement préalable par la polyvinylpolypyrrolidone (P.V.P.P.) qui adsorbe les anthocyanes et les tanins.

Une activation de la P.V.P.P. commerciale est nécessaire, pour accroître sa capacité d'adsorption et permettre son utilisation à l'état sec par simple agitation. La technique d'activation (GLORIES, 1975) comporte successivement un chauffage à 100° C pendant 1 heure en milieu HCl 6N, puis un rinçage sur colonne, par de l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent, enfin une lyophilisation.

Les composés phénoliques de l'échantillon sont éliminés de la façon suivante : 5 ml de vin sont ajoutés à 0,8 g de P.V.P.P. à l'état sec, préparés dans un petit flacon. Après une durée de contact de 10 mn.

l'échantillon est filtré dans une seringue munie d'un coton de verre à la sortie de son corps de cylindre. Cette opération est instantanée ; on peut éventuellement placer à la sortie de la seringue un deuxième dispositif de filtration sur membrane (1,2 µm) pour parfaire la limpidité de l'échantillon. Pour des vins très colorés deux passages sur P.V.P.P. peuvent être nécessaires.

III — MISE EN ŒUVRE DE LA SYRINGALDAZINE POUR LA DETERMINATION DE L'ACTIVITE LACCASE

La syringaldazine (figure 1) est obtenue chez EGA-CHIMIE (7-67000-Strasbourg). On prépare une solution 0,1 p. 100 dans l'éthanol absolu. Une sonification permet d'atteindre en quelques minutes une complète solubilisation. La solution obtenue présente une couleur jaune pâle ; d'une remarquable stabilité à l'oxydation chimique, elle peut séjourner pendant des semaines à l'air et à la température du laboratoire, sans altération. La quinone, formée par oxydation en présence de laccase, est colorée en rose-mauve ; son coefficient d'extinction moléculaire à 530 nm est de 65.000.

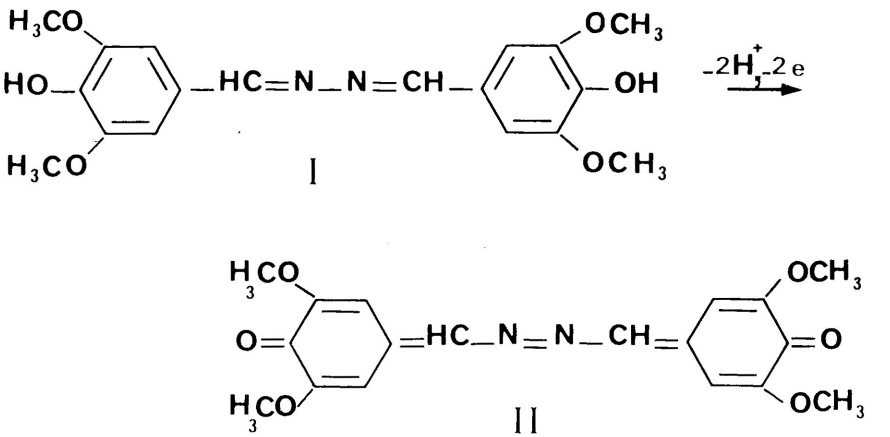


Fig. 1. — Schéma d'oxydation de la syringaldazine
I : forme réduite incolore
II : quinone colorée

La mesure de l'activité laccase s'effectue à 20 °C dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 5. Dans la cuve du spectrophotomètre, on mélange 0,6 ml de la solution de substrat (0,1 µmole), 1 ml d'échantillon (éventuellement dilué) et 1,4 ml de tampon. On enregistre une variation de densité optique à 530 nm, pendant quelques minutes ; dans ces conditions, la réponse est linéaire.

Une unité d'activité laccase (U) correspond à la quantité d'enzyme catalysant l'oxydation d'une nanomole de syringaldazine par minute, dans les conditions de la réaction.

Si x désigne la variation de densité optique à 530 nm par minute, l'activité laccase (A) par ml d'échantillon s'exprime par la relation :

$$A = \frac{x \cdot 3}{65.000} \text{ mmoles/ml}$$

$$A = \frac{x \cdot 300}{6,5} \text{ nmoles/ml}$$

65000 = coefficient d'extinction molaire du substrat.

3 = volume en ml de la cuve de mesure.

IV — COMPARAISON AVEC LA METHODE POLAROGRAPHIQUE

On opère sur un échantillon de milieu de culture, dépourvu d'activité tyrosinase. La consommation enzymatique d'oxygène est imputable à la seule activité laccase constitutive ; elle est mesurée à partir de dilutions successives du filtrat de la culture et en présence d'hydroquinone, substrat classique des mesures d'activité laccase (DUBERNET, 1974). Une des caractéristiques de l'électrode polarographique BECKMAN utilisée est sa très faible autoconsommation en oxygène.

L'étalonnage de la cellule (3,35 ml) est réalisé sur la solution d'hydroquinone (10 mM) dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 5, par saturation en oxygène (environ 8 mg/l), puis dégazage par un balayage d'azote.

On mélange, à 20 °C, 2,85 ml de la solution tamponnée du substrat et 0,5 ml de différentes solutions (1 à 0,2) du filtrat de culture. Une agitation magnétique dans la cellule fermée est maintenue pendant toute l'analyse.

RESULTATS

I — MISE AU POINT DE LA MESURE DE L'ACTIVITE LACCASE DANS LES MOUTS ET LES VINS

1° - **Comparaison de la sensibilité des dosages de l'activité laccase par la méthode colorimétrique à la syringaldazine et par la méthode polarographique en présence d'hydroquinone** (figure 2).

Les analyses de l'activité laccase constitutive d'un filtrat de culture de *Botrytis cinerea* sont effectuées sans traitement par la P.V.P.P., puisque le milieu ne contient pas de composés phénoliques.

La figure 2 montre que la méthode à la syringaldazine permet de détecter l'activité laccase pour une dilution au 1/20e d'un ml de milieu de culture. On enregistre une variation de densité optique (530 nm) de 0,015 par minute, correspondant à 0,7 U/ml.

La méthode polarographique, appliquée au même milieu, donne des valeurs de consommation d'oxygène par millilitre très faibles ; l'activité

laccase n'est pas significativement détectable dans les dilutions au 1/10e et au 1/3 du filtrat de culture. Elle le devient pour une dilution au 1/2, avec une consommation d'oxygène de 0,058 mg par litre de milieu réactionnel et par minute.

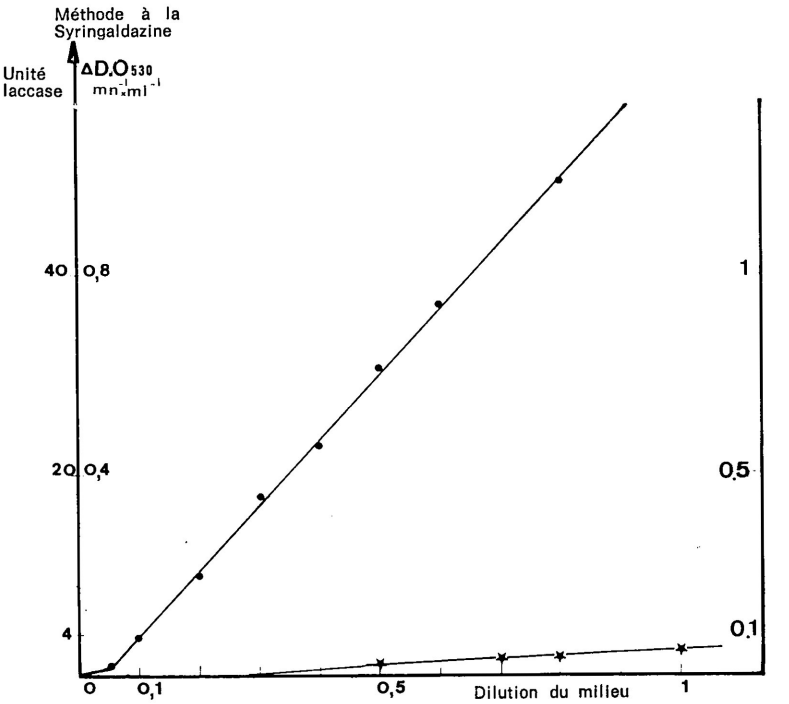


Fig. 2. — Comparaison de la sensibilité des dosages de l'activité laccase par la méthode polarographique (✳——✳) et la méthode colorimétrique à la syringaldazine (●——●) Les mesures sont effectuées sur les dilutions d'un filtrat de culture de **Botrytis cinerea.** dépourvu de composés phénoliques (CZAPEK)

La méthode spectrophotométrique à la syringaldazine apparaît donc dix fois plus sensible que la méthode polarographique. Elle est, en outre, plus rapide et plus facile à mettre en œuvre.

On note également sur la figure 2 que la pente de la courbe plus élevée dans le cas de la méthode à la syringaldazine, traduit une meilleure affinité de la laccase pour ce substrat, ce qui permet un dosage plus précis.

2° - **Incidence des composés phénoliques du raisin sain sur le dosage de l'activité laccase.**

L'activité laccase est dosée par la méthode à la syringaldazine dans trois moûts de Sémillon, issus de vendanges partiellement ou totalement botrytisées, ainsi que dans un filtrat de culture de *Botrytis.* Les mesures

sont effectuées avant et après traitement des échantillons par la P.V.P.P. dans les conditions précédemment décrites (Tableau I).

TABLEAU I

Incidence de l'élimination des composés phénoliques du raisin sain par la PVPP sur l'activité laccase déterminée par la méthode à la syringaldazine

	Activité laccase (U/ml)	
	Témoin	+ PVPP
Filtrat de culture de Botrytis cinerea	42,4	41,2
Raisin pourri "rôti" (100 p. 100)	56,5	60,9
Raisin pourri "plein" (100 p. 100)	4,8	18,5
Raisin pourri "plein" (30 p. 100)	1,1	7,8

Le traitement à la P.V.P.P. d'un milieu dépourvu de composés phénoliques (filtrat de culture CZAPEK de *Botrytis)* n'influe pas sur le dosage de l'activité laccase. On peut en déduire que la P.V.P.P. ne retient pas l'enzyme.

L'activité laccase mesurée est maximale pour les échantillons traités par la P.V.P.P. ; les composés phénoliques du raisin semblent donc interférer. Tout au moins dans les vins blancs, les composés phénoliques sont plus abondants dans les jus de raisins sains que dans ceux de raisins pourris (VOYATZIS, 1984). On explique ainsi que l'incidence du traitement soit d'autant plus importante que le degré de contamination de la vendange par la pourriture est faible.

3° - **Mode d'inhibition des composés phénoliques sur l'activité laccase.**

a) **Mesure de l'affinité de la laccase pour la syringaldazine** (figure 3).

Une solution mère de syringaldazine à 10 p. 100 dans l'éthanol absolu est diluée de 1 à 50 fois. On mélange dans la cuve du spectrophotomètre, 0,6 ml de l'une des dilutions précédentes, 1,4 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 5 et 1 ml de milieu de culture de *Botrytis cinerea* contenant 60 U/ml.

On enregistre les variations de densité optique au cours du temps ; la tangente à l'origine représente la vitesse initiale (V) ; on calcule le Km, inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, ainsi que la vitesse maximale de la réaction (V_m) à l'aide de la représentation classique de LINEWEAVER et BURK.

1/Km correspond à l'intersection (A) de la droite (figure 3, 1) d'équation $1/V = f(1/S)$ avec l'axe des abscisses (S est la molarité du substrat).

1/Vm représente l'ordonnée à l'origine (B) de cette droite.

Km = $6{,}25.10^{-5}$ et Vm = 2,0.

L'affinité de la laccase de *Botrytis cinerea* est donc plus forte pour la syringaldazine que pour l'hydroquinone, pour laquelle DUBERNET (1974) indique Km = $1{,}9.10^{-4}$.

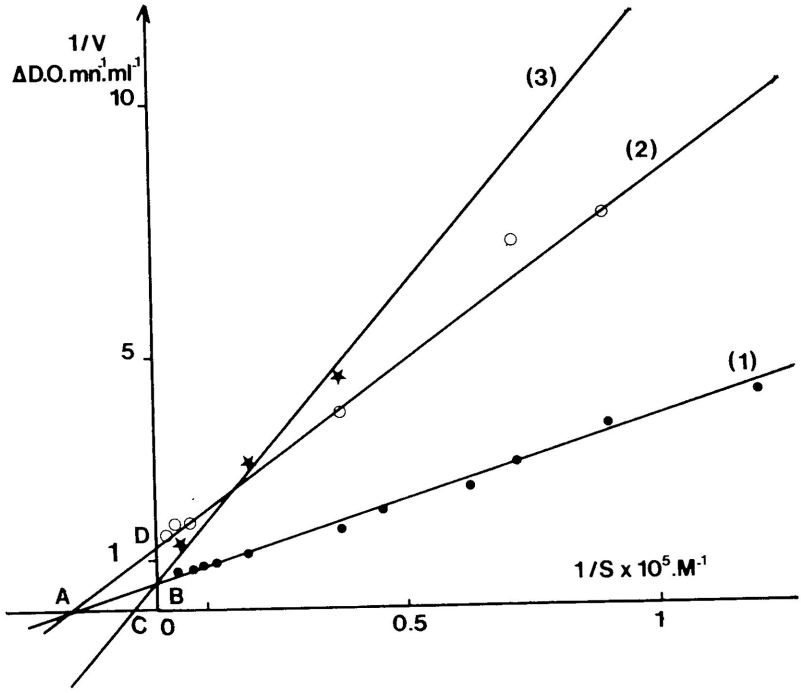


Fig. 3. — Cinétique de l'oxydation enzymatique de la syringaldazine (1) inhibition exercée par une concentration par litre de 10 mg de tanin (2) et de 13 mg d'anthocyanes (3)
A (-0,16 ; 0), B (0 ; 0,5), C (-0,03 ; 0), D (0 ; 1,2)

b) **Cinétique de l'oxydation de la syringaldazine en présence de tanins** (figure 3).

Une série de dilutions de la syringaldazine, identique à celle de l'expérience précédente, est réalisée. Dans le tampon acétate de sodium 0,1M pH = 5 sont dissous 10 mg/l de procyanidines extraites de pépins de raisins : 1,4 ml de cette solution sont placés dans la cuve, en présence de 1 ml d'extrait enzymatique (57,30 U/ml) et de 0,6 ml de substrat.

La figure 3, 2 montre que l'ordonnée à l'origine (D) plus élevée correspond à un Vm plus faible (0,83).

On note également que cette même courbe coupe l'axe des abscisses au même point (A) que la courbe témoin (1). Par conséquent les Km sont

identiques et l'affinité enzyme-substrat (1/Km) reste inchangée. Les tanins exercent donc une inhibition de type non compétitif sur l'activité laccase, à l'égard de la syringaldazine.

c) **Cinétique de l'oxydation de la syringaldazine en présence d'anthocyanes** (figure 3).

Une solution d'anthocyanes à 13 mg/l est utilisée dans le tampon acétate de sodium en remplacement de la solution de tanins ; dans ce cas Vm est inchangé (B) et Km augmenté (C). Les anthocyanes exercent une inhibition compétitive sur l'activité laccase, à l'égard de la syringaldazine.

4° - **Détermination de la dose optimale de P.V.P.P. pour l'élimination des composés phénoliques du moût** (figure 4).

Un moût de Sémillon issu de raisins pourris (taux d'environ 40 p. 100) est traité par des quantités croissantes de P.V.P.P. pendant 10 minutes. Les dosages de l'activité laccase sont effectués à l'issue de ce traitement. La vitesse initiale d'oxydation de la syringaldazine est maximum dans les échantillons traités par la P.V.P.P. à une dose supérieure ou égale à 0,8 g dans 5 ml ; cette manipulation a permis de fixer le mode opératoire tel qu'il a été précédemment décrit.

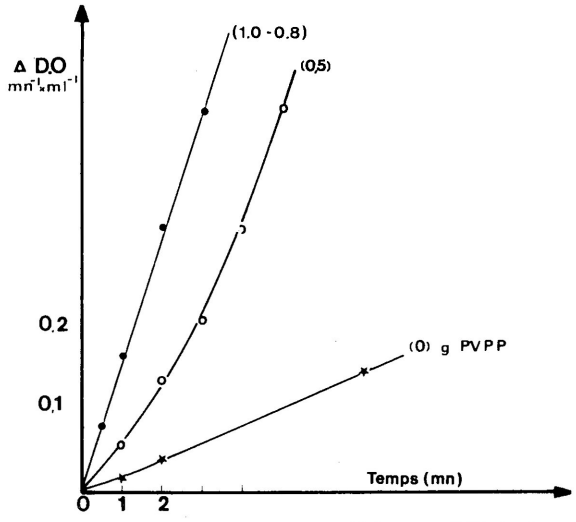


Fig. 4. — Détermination de la dose optimale de P.V.P.P. pour l'élimination des composés phénoliques du moût.
Les chiffres entre parenthèses indiquent les quantités de PVPP, exprimées en grammes, ajoutées à 5 ml de moût.

II — APPLICATIONS

1° - **Activité laccase de baies botrytisées.**

Des raisins blancs botrytisés sont prélevés sur des vendanges destinées à l'élaboration de vins blancs secs (Tableau II). L'activité laccase

des jus est comprise entre 14 et 27 U/ml. Le cépage ne semble pas influer sur le niveau d'activité laccase, mesurée en l'absence des composés phénoliques naturels du raisin.

Les raisins rouges botrytisés sont prélevés à l'époque des vendanges (Tableau II). Les teneurs en laccase, toujours en l'absence de composés phénoliques, sont inférieures (8 à 18 U/ml) à celles des raisins blancs. Ceci peut s'expliquer par la difficulté d'appréciation visuelle de l'état de pourriture des baies rouges. D'autre part, dans les conditions du millésime 1984, l'apparition de foyers de pourriture grise sur la vendange rouge a été plus tardive (quelques jours avant la récolte) que sur la vendange blanche.

TABLEAU II

Activité laccase de baies botrytisées prélevées au moment des vendanges 1984

Cépage		Date du prélèvement	Activité laccase (U/ml)
		Raisins blancs destinés à l'élaboration de vins blancs secs	
Sauvignon	N° 1	11 septembre	24,5
	N° 2	25 septembre	24,0
	N° 3	27 septembre	17,3
Sémillon	N° 1	3 octobre	26,7
	N° 2	2 octobre	14,3
	N° 3	10 octobre	25,0
Muscadelle	N° 1	11 septembre	18,9
	N° 2	25 septembre	24,5
	N° 3	2 octobre	19,4
		Raisins rouges	
Cabernet-Sauvignon	N° 1	2 octobre	14,3
	N° 2	4 octobre	3,4
	N° 3	19 octobre	17,0
	N° 4	24 octobre	18,5
Merlot		4 octobre	18,0
Cabernet-Franc		4 octobre	8,8

Le stade de développement de *Botrytis* sur la baie est un facteur déterminant du niveau d'activité laccase (Tableau III), d'autant plus importante que le stade de pourriture est plus avancé.

Dans les conditions du millésime 1984, les baies rouges isolées au stade de pourriture interne (PI) contiennent peu d'activité laccase

(0,8 U/ml). A l'apparition des conidiophores (BC), l'activité laccase augmente très nettement (18 U/ml). Elle est plus importante encore dans les raisins pourris flétris (PF) avec 42 U/ml.

TABLEAU III

Incidence du stade de pourriture sur l'activité laccase des moûts

Cépage	Stade de pourriture	Activité laccase (U/ml)
Cabernet-Sauvignon	Pourriture interne Bourrelet de conidiophores Pourri flétri	0,8 18,5 42,6
Sauvignon	Pourri "plein" Pourri "rôti"	20,3 56,0
Sémillon	Pourri "plein" Pourri "rôti"	33,2 71.0

Les jus issus de baies blanches cueillies aux stades « pourri plein » (PP) et « pourri rôti » (PR) manifestent des différences importantes, allant du simple au double, dans les niveaux d'activité laccase. Cet accroissement s'explique par la stabilité de l'enzyme, sa synthèse ininterrompue au cours de la surmaturation et le phénomène de concentration qui lui est associé.

2° - **Dosage de l'activité laccase dans des jus à la réception de la vendange** (Tableau IV).

Les jus issus de vendanges jugées saines ne contiennent pas d'activités laccase ou seulement des traces (<0,1 U/ml). Pour des vendanges faiblement contaminées (taux de pourriture inférieur à 10 p. 100), l'activité laccase demeure inférieure à 1 U/ml). Enfin pour des taux de pourriture plus importants, impossibles à quantifier visuellement, les activités laccases sont comprises entre 4 et 30 U/ml.

3° - **Présence de l'activité laccase dans les vins rouges nouveaux.**

En raison de sa stabilité en milieu acide mise en évidence par DUBERNET (1974), l'activité laccase demeure dans les vins nouveaux pendant plusieurs semaines. Durant cette période, le SO_2 joue un rôle déterminant dans la protection des vins à l'égard de la casse oxydasique et dans la destruction de l'activité laccase au cours des premiers mois d'élevage.

La méthode à la syringaldazine se prête également à un dosage rapide de la laccase résiduelle dans le vin (Tableau V) dont on peut suivre ainsi l'évolution.

TABLEAU IV

Activité laccase de différents moûts prélevés à la réception de la vendange.

Moût N°	Cépage	Mode de ramassage	Etat sanitaire des raisins	Activité laccase (U/ml)
1	Sémillon	Manuel sans tri	Contaminés	6,5
2	Sémillon	Machine	Sains	0
3	Sémillon	Machine	Sains	0
4	Sémillon	Machine	Faiblement contaminés	0,1
5	Sémillon	Manuel avec tri	Sains	0
6	Sémillon	Machine	Sains	0,2
7	Sémillon	Manuel sans tri	Sains	0
8	Sémillon	Manuel sans tri	Contaminés	27,8
9	Sémillon	Manuel sans tri	Contaminés	17,3
10	Sémillon	Manuel sans tri	Contaminés	4,4
11	Sémillon	Manuel sans tri	Faiblement contaminés	0,5
12	Sémillon	Machine	Contaminés	10,6
13	Sémillon	Machine	Sains	0
14	Muscadelle	Machine	Contaminés	11,8
15	Muscadelle	Machine	Contaminés	16,6
16	Ugni-Blanc	Machine	Faiblement contaminés	0,7
17	Ugni-Blanc	Machine	Faiblement contaminés	0,1
18	Ugni-Blanc	Machine	Faiblement contaminés	0
19	Ugni-Blanc	Machine	Contaminés	5,8
20	Ugni-Blanc	Machine	Contaminés	13,4
21	Merlot	Manuel avec tri	Contaminés	1,0
22	Merlot	Machine	Contaminés	4,6
23	Cabernet-Sauvignon	Machine	Contaminés	4,5
24	Cabernet-Sauvignon	Machine	Sains	0
25	Grenache	Machine	Contaminés	14,8
26	Grenache	Machine	Contaminés	12,9
27	Grenache	Machine	Contaminés	14,6
28	Grenache	Machine	Contaminés	13,2
29	Grenache	Machine	Contaminés	10,1
30	Grenache	Machine	Contaminés	8,4

Nous confirmons la stabilité, en l'absence de SO_2 libre, de la laccase ; par exemple, le vin n° 1 correspondant au moût 21 (Tableau IV) possède une activité laccase inchangée.

Les vins issus de vendanges jugées saines présentent une activité nulle. Dans les autres vins les valeurs s'échelonnent entre 8 U et des traces. Exposés 24 heures à l'air, les vins, dont l'activité laccase est supérieure à 3 U manifestent une sensibilité à la casse oxydasique.

TABLEAU V

Activité laccase et tenue à l'air de différents vins rouges issus de raisins, cépage Merlot, plus ou moins contaminés par *Botrytis cinerea* Analyses effectuées après la fermentation alcoolique et avant sulfitage

Vins N°	Etat sanitaire des raisins	Activité laccase (u/ml)	Tenue à l'air
1	contaminés	1,0	Bonne
2	sains	0,1	Bonne
3	contaminés	4,6	Casse
4	contaminés	0,5	Bonne
5	contaminés	7,8	Casse
6	contaminés	5,5	Casse
7	contaminés	3,7	Casse
8	contaminés	0,2	Bonne
9	contaminés	0,2	Bonne
10	sains	0	Bonne
11	sains	0	Bonne
12	sains	0	Bonne
13	sains	0	Bonne

DISCUSSION ET CONCLUSION

Très sensible et strictement spécifique du dosage de l'activité laccase, la méthode à la syringaldazine présente, par rapport aux autres méthodes utilisées jusqu'ici en œnologie, de nombreux avantages. Elle permet de mesurer l'activité laccase en présence de la tyrosinase du raisin, sans intervention d'un inhibiteur spécifique. Elle s'applique aussi bien à des jus de raisins qu'à des vins. L'élimination préalable des composés phénoliques est indispensable. Sa sensibilité est 10 fois supérieure à celle des mesures polarographiques utilisant l'hydroquinone comme substrat, en raison de la forte affinité de la syringaldazine pour la laccase de *Botrytis*

cinerea d'une part, et du fort coefficient d'extinction moléculaire de la syringaldazine oxydée, d'autre part.

Les composés phénoliques naturels du raisin exercent une inhibition sur l'oxydation par la laccase des substrats ajoutés pour la mesure. Un dosage rigoureux suppose donc l'élimination des tanins et des anthocyanes de l'échantillon avant l'analyse.

Les dosages effectués sur des jus de baies botrytisées montrent que le niveau d'activité laccase dépend essentiellement du stade de développement de la pourriture, paramètre difficile à apprécier visuellement dans une vendange hétérogène. Appliquée à des moûts et des vins nouveaux, la méthode proposée permet, sans nécessiter d'autre appareillage qu'un colorimètre, une détection quantitative rapide et reproductible d'activités laccase traduisant la contamination des vendanges par *Botrytis cinerea*.

Manuscrit reçu le 22 novembre 1984, accepté pour publication le 10 décembre 1984.

RÉSUMÉ

La méthode colorimétrique de dosage de l'activité laccase de *Botrytis cinerea* par la syringaldazine permet d'apprécier, dans les moûts et les vins nouveaux, l'état sanitaire des vendanges dont ils sont issus ; elle est spécifique et rapide.

Ce dosage ne nécessite pas l'inactivation de la tyrosinase ; cependant, l'élimination préalable des composés phénoliques du raisin est indispensable, car leur rôle inhibiteur sur l'oxydation de la syringaldazine est démontré.

L'activité laccase ainsi mesurée est liée au stade de développement de la pourriture, paramètre difficile à apprécier visuellement sur une vendange hétérogène.

SUMMARY

The syringaldazine assay has been adapted for quantitative determination of laccase activity from *Botrytis cinerea*, in must and new wines. This colorimetric method is fast, specific and sensible. It allows to appreciate the level of contamination of the crops by *Botrytis cinerea*.

The assay can be performed in presence of tyrosinase but the phenolic compounds of the grape must be discarded because of their inhibitor effects on syringaldazine oxidation by laccase.

So measured in botrytised grapes juices, laccase activity is related with the stages of development of the fungus.

ZUSAMMENFASSUNG

Die kolorimetrische Methode für die spezifische und schnelle Dosierung der Laccase-Wirkung « *Botrytis cinerea* » durch die Syringaldazine erlaubt es, im Most und im Wein den Sanitätszustand der Weinernte aus der sie stammen, zu begutachten.

Diese Dosierung wird ohne Hemmungs-Produkt der Tyrosinase durchgeführt. Vorher aber werden die phenolischen Bestandteile im Wein beseitigt, da sich bewiesen hat, dass sie eine Rolle in der Hemmung der Oxydation der Syringal-

dazine spielen. Die so gemessene Laccase-Wirkung scheint mit dem Fäuleentwicklungs-Stadium zusammen zu hängen ; visuell nur schwierig wahrnehmbares Parameter bei heterogenen Weinernten.

RESUMEN

Se trata aquí de un método colorimétrico eficaz que permite controlar el nivel de podredumbre de la uva, en mostos frescos o recién fermentados, midiendo la actividad encimática de la laccasa del *Botrytis cinerea* con siringalcacina.

No se necesita hacer caso de la tirosinasa pero, hay que eliminar previamente los compuestos fenólicos de la uva, porque son inhibitores cuando se oxida la siringaldacina.

Se puede entonces, relacionar la actividad de la laccase con el desarrollo de la podredumbre, cosa que no era evidente con sólo un vistazo de la vendimia.

RIASSUNTO

Il metodo colorimetrico, specifico e rapido di dosaggio dell'attività laccasi di *Botrytis cinerea* con la « syingaldazine » permette di stimare nei mosti e nei vini lo stato sanitario delle vendemmie da cui provengono.

Questo dosaggio é effettuato senza inibitore della tirosinase ma dopo eliminazione dei composti fenolici dell'uva, la cui parte inibitoria sull'ossidazione della « syringaldazine » é dimostrata.

L'attività laccasi cosi misurata sembra legata allo stadio di sviluppamento del marcio, parametro difficile a stimare visualmente su una vendemmia eterogenea.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CORDONNIER R., HURTREL J. et BIRON C., 1979. Relation entre le taux de pourriture de la vendange l'activité laccase et l'aptitude à la casse des moûts et des vins. Journées internationales du groupe polyphénol de Logrono.

DUBERNET M. et RIBÉREAU-GAYON P., 1973. Les polyphénoloxydases du raisin sain et du raisin parasité par *Botrytis cinerea. C.R. Acad. Sc. Paris,* **277**, Série D, 975-978.

DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea. Thèse, Bordeaux.*

DUBOURDIEU D., 1982. Recherches sur les polysaccharides secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. *Thèse de doctorat d'Etat, Bordeaux II.*

GLORIES Y., 1976. Recherches sur la structure et les propriétés des comsés phénoliques polymérisées des vins rouges. Fractionnement des composés phénoliques avec la polyvinyl pyrrolidone (PVP). *Connaissance Vigne Vin,* **10**, N° 1. 51-71.

HARKIN J.M. et OBST J.R., 1973. Syringaldazine an effective reagent for detecting laccase and peroxydase in fungi. *Experientia,* vol. 29, Fasc. 4, 381-387.

HARKIN J.M. et OBST. J.R., 1973. Lignification in trees indication of exclusive peroxydase participation. *Science,* vol. 160, 1973, 296-298.

HARKIN J.M., LARSEN J.M. et OBST J.R., 1974. Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia,* **66**, 469-476.

KOVAC V., 1979. Effet des moisissures du genre *Penicillium* sur l'activité laccase de *Botrytis cinerea. Ann. Technol. agric.,* **28**, N° 3, 345-355.

LEONOWICZ A. et GRZYWNOWICZ K., 1980. Estimation of Laccase in whirot fungi. *Papers.*

LINEWEAVER H. et BURK, D.D.J. *J. Am. Chem. Soc., 1934,* **56**, 658.

MAYER A.M., 1978. Les oxydases des raisins et des vins. *Ann. Technol Agric.* **27**, N° 1, 149-159, 1978.

SALGUES M., OLIVIERI C., CHABAS P. et PINEAU P., 1983. Présentation d'un matériel de mesure de la pourriture grise des raisins. *Bull. O.I.V.*

VOYATZIS I., 1984. Recherches sur les composés phénoliques des vins blancs. Interprétation de la couleur. *Thèse de doctorat de 3e cycle.* Bordeaux.