PRESENCE ET SIGNIFICATION DANS LES MOUTS ET LES VINS DE LA TYROSINASE DU RAISIN (*)

Marc DUBERNET et Pascal RIBEREAU-GAYON
Institut d'Œnologie
Université de Bordeaux II
351, Cours de la Libération
33405 Talence (France)

INTRODUCTION

La casse oxydasique des moûts et des vins est un phénomène très fréquemment rencontré dans la pratique des vinifications ; il est bien connu des œnologues et des praticiens. Cette question a donné lieu à de nombreuses recherches et, dès 1895, GOUIRAND démontre l'intervention d'enzymes, ou polyphénoloxydases, qui catalysent l'oxydation des composés phénoliques du moût et du vin à partir de l'oxygène moléculaire dissous. L'année suivante, les travaux fondamentaux de LABORDE (1896) laissent pressentir l'existence de deux oxydases, l'une provenant du raisin, l'autre secrétée par **Botrytis cinerea,** champignon de la pourriture qui parasite la baie ; l'auteur attribue à la seconde le rôle prépondérant dans la casse oxydasique.

Les observations de LABORDE semblent être passées à peu près inaperçues, puisque les nombreux travaux effectués par la suite sur cette question se rapportent essentiellement à la polyphénoloxydase du raisin, sans faire la distinction précise entre cette enzyme et celle de **Botrytis cinerea** (DEIBNER et RIFAI, 1963 a et b ; POUX, 1966 et 1967 ; IVANOV, 1967 a et b ; DEMEAUX et BIDAN, 1967 ; MONTERODO, 1969 a, b et c). Bien plus, une certaine confusion apparaît lorsque CASSIGNARD (1963) constate que les quantités de « polyphénoloxydases » contenues dans les moûts issus de raisins sains ou de raisins pourris sont du même ordre ; Il était ainsi difficile d'expliquer la plus grande sensibilité à la casse oxydasique des vins issus de raisins pourris par rapport aux vins issus de raisins sains.

(*) Travail effectué avec le concours du Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux.

Toutes ces difficultés ont été éclaircies récemment (DUBERNET et RIBEREAU-GAYON, 1973) lorsque nous avons démontré rigoureusement la nature différente des polyphénoloxydases du raisin et de **Botrytis cinerea.** Comme l'avaient montré HAREL et MAYER (1971), nous avons confirmé que l'enzyme du raisin est une tyrosinase ; mais nous avons établi en outre que l'enzyme de **Botrytis cinerea** est une laccase dont les propriétés sont différentes. En particulier on ne peut pas utiliser les mêmes réactions pour le dosage de l'une et de l'autre. Par conséquent, l'expression « polyphénoloxydase » est trop générale et désigne d'une manière imprécise les deux types d'enzymes d'oxydation du moût et du vin sans les différencier.

La grande sensibilité à l'oxydation des vins issus de vendanges pourries s'explique par deux raisons :

1° La laccase est beaucoup plus stable dans les vins que la tyrosinase.

2° La laccase oxyde très fortement les principaux composés phénolique des vins (tanins et anthocyanes) alors que la tyrosinase est peu active vis-à-vis de ces corps.

Nos recherches actuelles portent sur ces deux types d'enzymes et leur intervention dans la pratique de la vinification et de la conservation des vins. La présente publication est exclusivement consacrée aux problèmes relatifs à la tyrosinase provenant des raisins sains, qui concernent plus particulièrement la vinification des vins blancs. Les jus de raisin noir, ne contenant pas encore de tanins, sont eux-mêmes sensibles à l'oxydation catalysée par la tyrosinase. Mais dans la vinification en rouge, la mise en cuve se fait avant pressurage, immédiatement après le foulage et par conséquent la vendange se trouve rapidement protégée de l'oxydation par l'anaérobiose. Dans les vins faits, l'activité tyrosinase est éliminée par combinaison de la protéine enzymatique avec les tanins.

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Préparation des moûts.

Au laboratoire, les moûts sont obtenus, à partir de raisins sains et mûrs, à l'abri de l'air (sous azote) en utilisant un petit pressoir à main. A la cave expérimentale de l'Institut d'Œnologie le foulage et le pressurage sont effectués à l'aide d'un pressoir horizontal à l'abri complet de l'air (sous CO_2) selon la technique décrite par MARTINIERE et SAPIS (1967).

Préparation des extraits enzymatiques.

Afin de mesurer l'activité enzymatique de la tyrosinase contenue dans le raisin, dans le vin ou le moût, activité qui traduit la concentration de ces milieux en enzyme active, il est nécessaire d'en effectuer l'extraction. Cette extraction a pour rôle essentiel d'éliminer les polyphénols du raisin, du vin et du moût pour éviter qu'ils n'interfèrent dans le dosage de l'activité tyrosinase, réalisé à l'aide d'un substrat phénolique de référence.

a) **Extraction à partir du raisin.**

Les extraits sont préparés selon la méthode décrite par HAREL et MAYER (1971) à partir de 50 g de baies.

b) **Extraction à partir du moût.**

30 ml de moût sont centrifugés 1 mn à 40 000 g à 2 °C. Le surnageant est additionné de 45 ml d'acétone à — 20 °C puis le mélange est centrifugé 12 mn à 40 000 g à 2 °C. Le nouveau surnageant obtenu, contenant les substrats phénoliques du moût, est éliminé. Le culot comprenant les protéines enzymatiques est redissous dans 3 ml de tampon phosphate-citrate 0,1 M, pH 7,2. Une nouvelle centrifugation de 5 mn à 40 000 g permet d'éliminer les résidus insolubles. Le surnageant obtenu constitue l'extrait brut A du moût (tyrosinase soluble).

Le culot de la première centrifugation du moût brut est repris par 3 ml de tampon phosphate-citrate 0,1 M, pH 7,2 contenant 1 p. 100 de Triton X 100, détergent non ionique permettant la solubilisation de la tyrosinase particulaire liée aux membranes des chloroplastes. Le mélange est maintenu 30 mn à 2 °C pour permettre l'action du Triton X 100, puis centrifugé 5 mn à 40 000 g à 2 °C. Le surnageant constitue l'extrait brut B du moût (tyrosinase particulaire). Les extraits sont conservés à 2 °C.

c) **Extraction à partir du vin.**

30 ml de vin sont traités comme le surnageant résultant de la centrifugation du moût.

Ces méthodes permettent d'extraire quantitativement les tyrosinases d'un lot de raisin, d'un moût ou d'un vin. Leur reproductibilité et leur proportionnalité ont été testées et s'avèrent satisfaisantes. A titre d'exemple, le Tableau I donne les résultats obtenus pour des mesures faites en double sur trois moûts différents.

TABLEAU I

Reproductibilité de la méthode de mesure de l'activité tyrosinase dans le moût.

Moût N°	Activité soluble Δ Do/mn/ml	Activité particulaire Δ Do/mn/ml	Activité totale Δ Do/mn/ml
1	0,235 0,230	1,420 1,420	1,655 1,650
2	0,320 0,315	1,550 1,450	1,870 1,765
3	0,470 0,460	3,600 3,650	4,070 4,110

Mesure de l'activité tyrosinase.

Une méthode spectrophotométrique est utilisée consistant à mesurer la vitesse d'apparition du produit coloré du méthyl-4 pyrocatéchol, substrat phénolique choisi en référence.

Dans une cuve de verre de 1 cm de parcours optique, on ajoute à 2 ml de méthyl-4 pyrocatéchol 10 mM dans un tampon phosphate-citrate 0,1 M de pH 4,75, 0 à 1 ml d'extrait enzymatique. Le volume est alors complété à 3 ml par le même tampon phosphate-citrate. Le pH choisi correspond au pH optimum d'activité de l'enzyme étudiée. La concentration en oxygène est fixée à 8,1 mg par l correspondant à la saturation du milieu de réaction par de l'air à 25 °C. L'augmentation de densité optique à 400 nm (λ max d'absorption de la quinone correspondante) est mesurée à 25 °C à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam SP 500 équipé d'un enregistreur. Les résultats sont exprimés en ΔDo/mn/unité de volume d'extrait enzymatique. L'extraction étant quantitative, on peut rapporter le résultat au poids et au nombre de baies de raisin, également au volume de moût ou de vin.

Mesure de la vitesse de consommation en oxygène d'un moût ou d'un vin.

Les mesures sont faites à 25 °C dans une cellule thermostatée, à l'aide d'une électrode à oxygène type Oxi 39. Le moût ou le vin, amenés à 25 °C sont placés dans la cellule après avoir été saturés d'air. Les variations de la concentration en oxygène sont enregistrées au cours du temps. La cellule pleine ne contient plus de phase gazeuse. Grâce à un système de pointeau, on peut introduire dans la cellule, à tout moment de la mesure, à l'aide d'une seringue, une substance quelconque (un inhibiteur par exemple) sans apporter d'oxygène. Un barreau aimanté permet d'agiter le moût ou le vin

tout au long de la mesure, afin d'éviter un appauvrissement artificiel en oxygène au niveau de l'électrode, dû à une légère consommation propre de cette électrode.

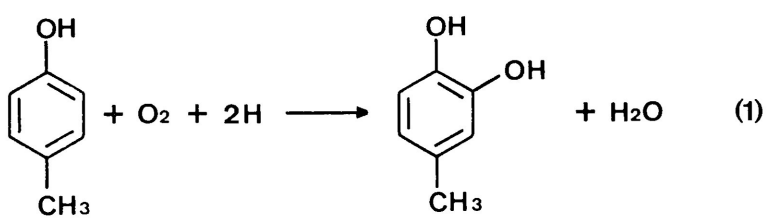
RESULTATS ET DISCUSSION

A. - PROPRIETES GENERALES DE LA TYROSINASE DU RAISIN

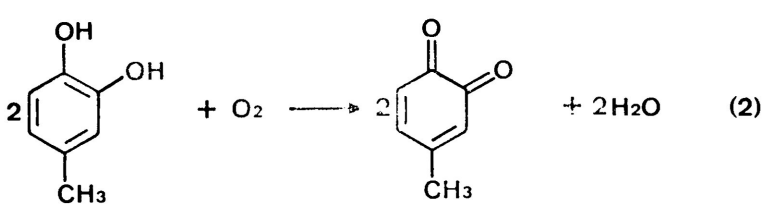
a) **Nature et propriétés.**

Les tyrosinases, dont le nom officiel adopté par la Commission des Enzymes de l'Union internationale de Biochimie, est o-diphénol : O_2 oxydo-réductase (EC 1.10.3.1), font partie du groupe des oxydases contenant du cuivre, qui comprend aussi les laccases et les acide ascorbique-oxydases. Les tyrosinases catalysent l'oxydation d'un nombre limité de composés phénoliques, exclusivement monophénols ou ortho-diphénols, en utilisant l'oxygène moléculaire. Il est classique de définir pour ces enzymes deux types différents d'activité susceptibles d'intervenir successivement (MALMSTROM et RYDEN, 1968) :

1° L'oxydation d'un monophénol en orthodiphénol (1) ; il s'agit de l'activité crésolase de la tyrosinase.



2° L'oxydation d'un ortho-diphénol en ortho-quinone (2) ; il s'agit de l'activité catécholase de la tyrosinase.



La tyrosinase du raisin ne présente qu'une faible activité crésolase (HAREL et MAYER, 1971 ; DUBERNET et RIBEREAU-GAYON, 1973) et n'oxyde efficacement que les ortho-diphénols.

L'action des tyrosinases ainsi d'ailleurs que celle des laccases se traduit par la formation de quinones présentant une coloration jaune plus ou moins intense et ayant pour propriété essentielle de posséder une très grande réactivité chimique. En particulier elles sont susceptibles de réagir entre elles ou même avec des polyphénols non oxydés et de conduire à des composés polymérisés de structure complexe et de couleur brune plus ou moins foncée du type des mélanines. Ce phénomène explique la couleur des vins atteints de casse oxydasique. Lorsque le degré de condensation des mélanines devient important, il peut se produire une précipitation qui, dans le cas des vins et particulièrement des vins rouges, entraîne l'élimination d'une partie de la matière colorante.

b) **Localisation intracellulaire.**

POUX (1966) a montré que l'activité oxydasique des raisins, retrouvée dans le moût, est liée à des particules ; par conséquent dans le raisin, la protéine enzymatique n'est pas libre, mais associée à une structure intracellulaire dont il a été démontré par HAREL et MAYER (1971) qu'il s'agit des chloroplastes. Sous l'action de certains traitements mécaniques ou chimiques du raisin, l'enzyme peut être détachée des chloroplastes et en quelque sorte solubilisée. Ainsi, dans la suite de cet article nous feront la distinction entre l'activité tyrosinase particulaire, c'est-à-dire encore liée aux chloroplastes, et l'activité tyrosinase soluble, correspondant à l'enzyme libérée dans le milieu qui peut être soit du moût soit une solution tampon utilisée pour la préparation d'extraits enzymatiques.

Dans le raisin toute l'enzyme est particulaire mais, lors de la préparation des moûts, on assiste à une solubilisation partielle de la tyrosinase. En outre, il est possible de provoquer cette solubilisation en détruisant les structures membranaires des chloroplastes, auxquelles l'enzyme est liée, par l'utilisation d'un détergent (TRITON X 100 par exemple) (HAREL et MAYER, 1971). Cette technique est utilisée pour la détermination de l'activité tyrosinase particulaire d'un moût et pour extraire l'enzyme du raisin (cf. techniques expérimentales). En effet, la méthode de mesure de l'activité tyrosinase utilisée ne peut s'appliquer qu'à une enzyme solubilisée.

Le rôle physiologique de la tyrosinase, bien qu'il ait fait l'objet de nombreuses hypothèses, reste tout à fait obscur.

B. - PRESENCE ET PROPRIETES DE LA TYROSINASE DU RAISIN DANS LES MOUTS

a) **Présence et taux.**

Nous avons vu que dans les moûts, l'activité tyrosinase pouvait se présenter sous deux formes : activité particulaire et activité soluble. Les méthodes utilisées permettent d'extraire et de mesurer séparément ces deux activités. Le tableau II donne une illustration de ces mesures réalisées dans différents moûts issus de raisins mûrs et sains de différents cépages. La mesure de l'activité traduit le taux de tyrosinase active contenu dans le moût.

TABLEAU II

Activité tyrosinase de différents moûts.

Cépages et lieux de récolte	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Activité particulaire (ΔDo/mn/ml)	Activité totale (ΔDo/mn/ml)
Cabernet-Sauvignon (Médoc) .	0,830	1,920	2,750
Merlot (Médoc)	2,200	2,280	4,480
Sémillon (1[ers] Côtes Bordeaux)	0,780	2,350	3,130
Sémillon (Sauternes)	0,190	2,110	2,240
Ugni blanc (Blayais)	0,140	2,000	2,140
Merlot blanc (Graves de Vayres)	0,460	3,650	4,110

Il apparaît que l'activité tyrosinase est présente dans tous les moûts et que les variations observées entre les différents cépages ne sont pas très importantes.

La solubilisation d'une partie de l'activité est mise en évidence, et dans les cas étudiés, cette activité soluble représente 8 à 50 p. 100 de l'activité totale. Les causes de cette solubilisation, de même que les raisons qui font qu'elle est plus ou moins importante suivant les moûts ne sont pas évidentes. Le pH acide des moûts peut être un facteur favorable.

D'autre part, si l'on compare les activités trouvées dans les moûts à l'activité totale susceptible d'être extraite des raisins de même cépages

(tableau III), on constate, sachant que 1,2 g de raisin donne environ 1 ml de moût, que la plus grande partie de l'activité présente dans le raisin se retrouve dans le moût.

TABLEAU III

Activité tyrosinase de raisins sains et mûrs de différents cépages.

Cépages	Activité tyrosinase (ΔDo/mn/g de poids frais)
Cabernet-Sauvignon	4,200
Merlot	6,200
Sémillon	4,100
Ugni blanc	2,900

b) **Influence du pressurage sur le taux de tyrosinase d'un moût.**

La plus grande sensibilité à l'oxydation des moûts obtenus en fin de pressurage est un phénomène couramment observé dans la pratique. Le tableau IV montre qu'il peut être relié à une augmentation de l'activité tyrosinase des moûts au cours du pressurage. Ainsi, les moûts obtenus en fin de pressurage sont-ils, dans l'exemple choisi, deux fois plus riches en tyrosinase que ceux produits en début de pressurage.

TABLEAU IV

Activité tyrosinase d'un moût à divers stades du pressurage.

Stades du pressurage	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Activité particulaire (ΔDo/mn/ml)	Activité totale (ΔDo/mn/ml)
Premier quart	0,125	0,550	0,675
Deuxième quart	0,180	0,625	0,850
Troisième quart	0,225	0,900	1,125
Quatrième quart	0,220	1,000	1,220

c) **Influence du sulfitage sur l'activité tyrosinase d'un moût.**

L'action anti-oxydasique de l'anhydride sulfureux est bien connue. Mais la question suivante n'a jamais été élucidée : cette action se traduit-elle

par une destruction de l'activité tyrosinase, ou bien par une simple inhibition de cette activité ? Un premier élément de réponse à cette question est apporté par le tableau V qui donne l'activité tyrosinase d'un moût issu de raisins sains de cépage Ugni Blanc, 30 minutes après addition de doses croissantes de SO_2. Le processus d'extraction de l'activité tyrosinase mis en œuvre, afin d'en effectuer la mesure, permet d'éliminer totalement le SO_2. Ainsi, au moment de la mesure, il ne reste plus de SO_2 dans le milieu réactionnel et seule apparaît l'action de destruction de l'activité tyrosinase par le SO_2 qui est intervenue dans le moût.

TABLEAU V

Activité tyrosinase d'un moût après addition de SO_2

Dose de SO_2 (mg/l)	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Activité particulaire (ΔDo/mn/ml)	Activité totale (ΔDo/mn/ml)	Perte d'activité (%)
0	0,300	1,870	2,170	
5	0,270	1,370	1,640	— 24
20	0,100	0,735	0,825	— 62
40	0,015	0,225	0,240	— 89
80	0,005	0,030	0,035	— 98,5
100	0,007	0,005	0,012	— 99,5

Les résultats peuvent présenter des différences d'un moût à l'autre, mais il est indiscutable que le SO_2 exerce, sur la tyrosinase, un effet de destruction.

Dans les moûts, un éventuel effet inhibiteur du SO_2 sur l'activité tyrosinase, qui empêcherait celle-ci de s'exprimer mais sans la détruire est plus difficile à mettre en évidence. Une des manifestations de la présence de tyrosinase dans les moûts se traduit par leur capacité de consommer de l'oxygène (DUBERNET et RIBEREAU-GAYON, à paraître). Cette consommation peut être mesurée au cours du temps, grâce à une électrode à oxygène qui, plongée dans le moût, donne la concentration en oxygène. On constate ainsi l'arrêt, par le sulfitage, de la consommation en oxygène d'un moût, préalablement saturé par de l'air (tableau VI).

Or, nous avons vu précédemment que, pour des doses de SO_2 inférieures à 40 mg par l, une grande partie de l'activité tyrosinase n'était pas détruite. Cette nouvelle expérience montre en outre que le sulfitage em-

pêche l'activité résiduelle de l'exprimer. Ce fait met en évidence un effet inhibiteur du SO_2 sur l'activité tyrosinase qui s'ajoute à l'effet destructeur.

TABLEAU VI

Influence du sulfitage sur la consommation en oxygène d'un moût.

Temps (en minutes)	Moût témoin concentration en oxygène (mg O_2/l)	Moût sulfité concentration en oxygène (mg O_2/l)
0	7,5	7,5
1	5,2	5,2
Sulfitage (30 mg/l) :		
2	3,1	3,5
3	1,3	3,4
4	0,2	3,4
5	0	3,4

d) **Evolution de l'activité tyrosinase au cours de l'oxydation d'un moût.**

Les produits d'oxydation des polyphénols sont des inhibiteurs puissants de toutes les enzymes (DAWSON et TARPLEY, 1951 ; BONNER, 1957 ; LOOMIS et BATTAILE, 1966 ; ANDERSON, 1968) et en particulier des tyrosinases qui justement catalysent la formation de ces produits. Selon LOOMIS (1969) l'inhibition est due à une condensation covalente irréversible des quinones avec les groupes réactifs des protéines et peut-être aussi à une oxydation, par les quinones, des sites fondamentaux des protéines.

TABLEAU VII

Evolution de l'activité tyrosinase au cours de l'oxydation d'un moût.

Nombre de saturation en air	Couleur du moût	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Perte d'activité (%)	Activité particulaire (ΔDo/mn/ml)	Perte d'activité (%)	Activité totale (ΔDo/mn/ml)	Perte d'activité (%)
0	Clair	0,235		2,000		2,235	
1	Jaune	0,145	— 38	1,750	— 12	1,895	— 19
2	Brun	0,045	— 81	1,400	— 30	1,445	— 38

Il était important de vérifier si cette inhibition de l'activité tyrosinase intervient, dans la pratique, au cours de l'oxydation des moûts. Le tableau VII donne l'activité tyrosinase d'un moût issu de raisins sains de cépage Ugni Blanc mesurée au cours d'une oxydation de ce moût comportant plusieurs saturations par l'air à 25 °C. Les mesures d'activité tyrosinase se font après la consommation par le moût de l'oxygène dissous lors de chaque saturation. La même manipulation a été réalisée sur le moût centrifugé, donc ne contenant plus que l'activité tyrosinase soluble (tableau VIII).

TABLEAU VIII

Evolution de l'activité tyrosinase au cours de l'oxydation d'un moût centrifugé.

Nombre de saturation en air	Couleur du moût	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Perte d'activité (%)
0	Clair	0,215	
1	Jaune	0,170	— 21
2	Brun	0,100	— 53

Les résultats montrent indiscutablement, au cours de l'oxydation des moûts, une diminution sensible de l'activité tyrosinase et plus particulièrement de l'activité tyrosinase soluble.

C. - EVOLUTION DE L'ACTIVITE TYROSINASE DES MOUTS

a) **Influence des traitements préfermentaires.**

TABLEAU IX

Activité tyrosinase du moût de départ.

Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Activité particulaire (ΔDo/mn/ml)	Activité totale (ΔDo/mn/ml)
0,78	2,37	3,15

Afin d'étudier l'évolution de l'activité tyrosinase des moûts au cours des traitements préfermentaires et de la fermentation, un moût a été

préparé à l'abri de l'air, par pressurage sous atmosphère de gaz carbonique, à partir de raisins sains de cépage Sémillon. Son activité tyrosinase initiale, mesurée après homogénéisation, est donnée dans le tableau IX

Le moût est alors séparé en 12 lots répartis en cantines de 20 litres, subissant un ou plusieurs des quatre traitements préfermentaires suivants :

1 — Aération : le moût est placé dans la cantine ouverte et agité pendant 2 heures.

2 — Traitement à la bentonite : le moût reçoit 100 g par hl de bentonite préalablement gonflée à l'eau.

3 — Sulfitage : la dose de SO_2 utilisée est de 80 mg par l.

4 — Débourbage : il est effectué après un repos de 16 heures.

La répartition des différents traitements sur les 12 lots de moût est donnée dans le tableau X, de même que l'activité tyrosinase de chacun de ces lots, mesurée immédiatement après application de ces traitements.

TABLEAU X

Répartition des traitements préfermentaires et mesure de l'activité tyrosinase demeurant après ces traitements.

Lots N°	Traitements	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Activité particulaire (ΔDo/mn/ml)	Activité totale (ΔDo/mn/ml)	Perte d'activité par rapport au lot 1 (témoin) (%)
1		0,800	2,040	2,840	0
2	A	0,205	2,200	2,405	— 15
3	B	0,040	1,900	1,940	— 32
4	A B	0,017	1,900	1,917	— 33
5	S	0,042	0,500	0,542	— 81
6	A S	0,095	0,600	0,695	— 76
7	B S	0,036	0,525	0,560	— 80
8	A B S	0,006	0,700	0,706	— 75
9	S D	0,035	0,250	0,285	— 90
10	A D	0,325	1,000	1.325	— 53
11	B S D	0,021	0,250	0,271	— 91
12	A B D	0,100	0,890	0,990	— 68

A = aération ; B = bentonite ; S = sulfitage ; D = débourbage.

On retrouve dans les résultats de ce tableau la baisse de l'activité soluble par aération déjà signalée, sauf dans les échantillons 5 et 6 pour lesquels le sulfitage qui a un effet prépondérant, a pu être un peu plus efficace dans le moût 5 que dans le moût 6.

L'addition de bentonite (lots n^{os} 3 et 4) diminue considérablement l'activité tyrosinase soluble sans diminuer l'activité particulaire.

L'addition de SO_2 (lots n^{os} 5 et 6), entraîne une baisse de l'activité totale de 75 p. 100. L'activité soluble et l'activité particulaire sont également diminuées.

L'addition conjointe de SO_2 et de bentonite (lots n^{os} 7 et 8) conduit à un résultat comparable à celui obtenu par simple addition de SO_2.

Le débourbage, ajouté au sulfitage, (lot n° 9) permet, par rapport aux lots n'ayant subi que le sulfitage, une diminution importante de l'activité particulaire et, ainsi, une diminution de l'activité totale de 50 p. 100.

Le débourbage seul (lot n° 10), entraîne une diminution de 50 p. 100 de l'activité particulaire par rapport aux lots témoins 1 et 2.

L'addition simultanée de SO_2 et de bentonite, ajoutée au débourbage (lot n° 11), donne un résultat comparable à celui obtenu en combinant sulfitage et débourbage (lot n° 9).

Dans le lot n° 12, la bentonite diminue l'activité soluble, le débourbage l'activité particulaire.

En conclusion, on constate que le traitement le plus efficace pour diminuer l'activité tyrosinase est le sulfitage (— 75 p. 100). Le débourbage élimine 50 p. 100 de l'activité totale, alors que la bentonite n'entraîne une diminution que de l'activité soluble.

b) **Influence de la fermentation.**

Chaque cantine est alors équipée d'un barboteur afin d'éviter tout contact du moût avec l'air, puis placée dans un local tempéré afin d'obtenir la fermentation.

Une nouvelle mesure de l'activité tyrosinase de chacun des lots est effectuée en cours de fermentation ; les résultats en sont donnés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Activité tyrosinase au cours de la fermentation.

Lots N°	Traitements	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)	Activité particulaire (ΔDo/mn/ml)	Activité totale (ΔDo/mn/ml)	Perte d'activité % de l'activité avant fermentation
1		0,340	0,830	1,170	— 51
2	A	0,180	0,680	0,860	— 64
3	B	0,012	0,650	0,660	— 66
4	A B	0,010	0,600	0,610	— 68
5	S	0,060	0,350	0,410	— 25
6	A S	0,090	—	—	
7	B S	0,015	0,360	0,375	— 33
8	A B S	0,012	—	—	
9	S D	0,022	0,085	0,117	— 60
10	A D	0,210	0,600	0,810	— 39
11	B S D	0,000	0,165	0,165	— 40
12	A B D	0,040	0,700	0,740	— 25

A = aération ; B = bentonite ; S = sulfitage ; D = débourbage.

On constate dans tous les cas une importante diminution de l'activité tyrosinase au cours de la fermentation ; cette diminution peut être liée à une action des levures sur la molécule protéique de l'enzyme. D'autre part, les conclusions que l'on peut tirer de ce tableau sur l'efficacité des différents traitements préfermentaires confirment les résultats obtenus avant fermentation (cf. tableau X).

Après fermentation, les vins sont soutirés mais non sulfités. Ils sont clairs et ne contiennent donc plus de particules en suspension ; l'activité particulaire se trouve ainsi éliminée et seule peut subsister l'activité soluble. Le tableau XII donne la mesure de celle-ci pour chacun des 12 vins.

Dans la majorité des lots, on observe une augmentation de l'activité soluble par rapport aux mesures effectuées en cours de fermentation. Ce phénomène est probablement dû à une solubilisation partielle de l'activité particulaire : il est surtout sensible dans les lots 1 et 2 pour lesquels l'activité tyrosinase est d'ailleurs plus importante que la somme des activités soluble et particulaire mesurées en cours de fermentation. Ce fait difficile à interpréter mériterait d'être expliqué. On peut supposer que pendant la fermentation la présence de levures affecte les conditions d'extraction.

TABLEAU XII

Activité tyrosinase après fermentation

Lots N°	Rappel des traitements	Activité soluble (ΔDo/mn/ml)
1		1,800
2	A	1,400
3	B	0,155
4	A B	0,090
5	S	0,270
6	A S	0,110
7	B S	0,055
8	A B S	0,000
9	S D	0,170
10	A D	0,450
11	B S D	0,015
12	A B D	0,020

A = aération ; B = bentonite ; S = sulfitage ; D = débourbage.

En ce qui concerne l'efficacité des différents traitements préfermentaires sur la diminution de l'activité tyrosinase du vin fait, le tableau précédent montre les faits suivants :

— L'addition de bentonite ou le sulfitage permettent une bonne élimination de l'activité tyrosinase pouvant se retrouver dans le vin.

— Le débourbage seul apparaît moins efficace et l'aération ne possède qu'une influence réduite.

— Les combinaisons de 2 ou des 3 traitements (sulfitage, addition de bentonite et débourbage) donnent dans tous les cas une bonne élimination de la tyrosinase.

c) **Conséquences de la présence d'activité tyrosinase dans le vin.**

Ainsi, il existe dans onze des douze vins étudiés une activité tyrosinase résiduelle. Nous avons cherché à préciser l'influence éventuelle de cette activité sur la tenue des vins avec les déterminations suivantes :

1° Indice de Folin, indiquant leur teneur en composés phénoliques totaux.

2° Vitesse de consommation en oxygène, après saturation par une agitation à l'air à une température de 25 °C.

3° Tenue à l'air ; l'évolution de la couleur du vin placé à l'air est notée au cours du temps.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

Indice de Folin, vitesse de consommation en oxygène et tenue à l'air des vins.

Lots N°	Rappel des traitements	Activité tyrosinase (ΔDo/mn/ml)	Indice de Folin	Vitesse de consommation en oxygène (mg O_2/l/5 mn)	Essai de tenue à l'air Couleur après			
					0 h	1 h	6 h	12 h
1		1,800	5,8	2,40	1	5		
2	A	1,400	4,7	0,85	1	4	5	
3	B	0,090	5,0	0,75	1	3	5	
4	A B	0,155	4,0	0,30	1	2	3	5
5	S	0,270	5,4	0,45	1	1	3	5
6	A S	0,110	4,2	0,15	1	1	2	3
7	B S	0,055	6,0	0,10	1	1	1	1
8	A B S	0,000	5,0	0,00	1	1	1	1
9	S D	0,170	5,6	0,20	1	1	2	3
10	A D	0,450	4,4	0,50	1	3	5	
11	B S D	0,015	5,4	0,05	1	1	1	1
12	A B D	0,020	4,0	0,05	1	1	2	2

A = aération ; B = bentonite ; S = sulfitage ; D = débourbage.

1 = clair ; 2 = jaune ; 3 = jaune foncé ; 4 = brun clair ; 5 = brun.

L'étude de ce tableau permet de tirer plusieurs conclusions :

1° Comme dans les moûts, la présence de tyrosinase se traduit, dans les vins, par une possibilité de consommation de l'oxygène dissous. Ainsi le vin n° 8, ne contenant plus d'activité tyrosinase, ne consomme plus d'O_2, du moins à une vitesse suffisante pour pouvoir être mesurée par la méthode utilisée. Cependant il n'y a pas de proportionnalité entre l'activité tyrosinase et la consommation en oxygène qui en est la manifestation.

2° La tenue des vins à l'air est en corrélation directe avec leur vitesse de consommation en oxygène.

ISVV

3° Quelques soient les autres traitements subis, une différences très nette apparaît entre les vins aérés et ceux qui ne l'ont pas été. Les vins provenant de moût aérés (lots 2, 4 et 6) ont une vitesse de consommation en O_2 très sensiblement plus faible que les vins provenant de moûts non aérés mais ayant subi les mêmes traitements (respectivement lots 1, 3 et 5). Ce phénomène, que nous avons observé lors d'autres expérimentations, peut s'expliquer par la diminution de l'activité tyrosinase due à l'action des produits d'oxydation des polyphénols (cf. tableau VII), mais aussi par la diminution sensible dans tous les cas de la teneur des vins aérés en composés phénoliques totaux (indice de Folin). Etant donné que proportionnellement, la diminution de la vitesse de consommation en oxygène est beaucoup plus grande que la baisse de l'activité tyrosinase, on peut penser que c'est surtout la diminution de la teneur en composés phénoliques totaux qui intervient dans l'augmentation de la résistance à l'oxydation du vin issu d'un moût aéré. Il est permis de penser d'ailleurs que les composés phénoliques éliminés sont les plus facilement oxydables, et donc les plus dangereux pour le vin dans le cas où ils s'y retrouvent.

4° Si l'on compare les lots 2 et 3 (bentonite) et les lots 3 et 4 (SO_2), on constate que pour des activités tyrosinases du même ordre, les vins bentonités consomment l'O_2 plus vite que les vins sulfités. Cela confirme que le SO_2 n'a pas seulement une action destructrice sur une partie de la tyrosinase mais qu'en plus, il empêche l'activité tyrosinase résiduelle de s'exprimer par un effet d'inhibition.

Quel est alors le devenir de l'activité tyrosinase contenue dans les vins étudiés ? Dans la mesure où aucun traitement supplémentaire n'est appliqué et au cours d'une conservation menée à une température de 20 °C l'activité tyrosinase diminue, jusqu'à disparaître au bout de quelques mois. Par contre, si les vins sont sulfités lors du soutirage, à une dose de 60 mg de SO_2 par litre, toute activité tyrosinase est immédiatement éliminée, sauf dans le cas du vin n° 1 où elle est cependant abaissée de 90 p. 100. Les vins ainsi sulfités ne consomment plus d'oxygène à une vitesse mesurable par les méthodes utilisées et sont stables à l'air.

CONCLUSIONS

Les résultats exposés dans ce travail permettent de mieux comprendre le rôle joué par la tyrosinase du raisin dans l'élaboration des vins, plus particulièrement des vins blancs et rosés. Il est montré d'abord que cette enzyme, liée dans le raisin aux chloroplastes, se retrouve dans les moûts sous forme soluble dans le jus et sous forme particulaire associée aux bourbes ; son extraction est fonction de l'intensité du pressurage. La tyro-

sinase est responsable de la grande oxydabilité des moûts et oblige à proscrire certaines pratiques, comme le foulage des raisins à la vigne ou même l'écrasement des raisins dans les récipients de ramassage. Le sulfitage du moût a un double effet ; d'une part il détruit partiellement l'enzyme, d'autre part il exerce une inhibition sur le fonctionnement de l'enzyme résiduelle mise en évidence par le blocage total de la consommation de l'oxygène dissous.

Un résultat important a été la démonstration de la moins grande sensibilité à l'oxydation des vins issus de moûts ayant eux-mêmes subi une oxydation modérée, correspondant au traitement normal des vendanges blanches, par rapport aux vins issus des mêmes moûts manipulés à l'abri de l'air. En ce sens la tyrosinase a une action favorable en vinification, tout au moins dans la mesure où son intervention reste limitée. Ce fait peut s'interpréter par deux observations : d'une part, par la destruction partielle de la tyrosinase au cours de l'oxydation qu'elle catalyse, d'autre part, par la disparition d'une fraction des composés phénoliques qui sont les substrats de l'oxydation. Il a été montré par ailleurs (MARTINIERE et SAPIS, 1967) qu'une telle aération n'est pas préjudiciable à la qualité. Nos propres observations (DUBERNET et RIBEREAU-GAYON, résultats à paraître) montrent que des vins blancs issus de moûts de raisins sains ayant subi une oxydation ont des couleurs peu différentes de celles de vins issus des mêmes moûts manipulés à l'abri complet de l'air ; les mélanines, produits bruns formés lors de l'oxydation des moûts, sont éliminées au cours de la fermentation, probablement par adsorption sur les levures.

L'addition de bentonite et le débourbage constituent deux autres traitements du moût qui diminuent l'activité tyrosinase du vin.

En fonction des traitements subis par les moûts, les vins blancs et les vins rosés, peuvent présenter, après l'achèvement de la fermentation alcoolique, des activités tyrosinases variables qui leur confèrent une plus ou moins grande sensibilité à l'oxydation. Dans tous les cas, le sulfitage, lors du premier soutirage, élimine complètement cette activité.

Dans les vins rouges, on ne retrouve jamais l'activité tyrosinase ; nous avons montré en effet que cette enzyme est très sensible à l'action inhibitrice des tanins, liée à la propriété de ces corps de donner des combinaisons avec les protéines.

Cette étude concerne exclusivement la tyrosinase provenant des raisins sains; les raisins pourris contiennent en outre une laccase (DUBERNET

et RIBEREAU-GAYON, 1973) dont les conséquences technologiques seront décrites par ailleurs.

Manuscrit reçu le 10 décembre 1973.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSON J.W., 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. **Phytochem.,** vol. 7, 1973-1988.

BONNER W.D., 1957. Soluble oxidase and their functions. **Ann. Rev. Plant Physiol.,** 8, 427-452.

CASSIGNARD R., 1963. Etude expérimentale de la vinification en blanc. **Thèse doctorat d'université,** Bordeaux.

DAWSON C.R. et TARPLEY W.D., 1951. Copper oxidases, in **The Enzymes,** Sumner J.B. et Myrback K. Eds, Academic Press, New York, Vol. II, Part. I, 454-498.

DEIBNER L. et RIFAI H., 1963 (a). Die Polyphenoloxydase im Traubensaft. I. **Mitteilungen,** Serie A, n° 2, 56-70.

DEIBNER L. et RIFAI H., 1963 (b). Die Polyphenoloxydase im Traubensaft. I. **Mitteilungen,** Serie A, n° 3, 113-119.

DEMEAUX M. et BIDAN P., 1967. Etude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de raisin. **Ann. Technol. agric.,** 16, 2, 75-79.

DUBERNET M. et RIBEREAU-GAYON P., 1973. Les « polyphénoloxydases » du raisin sain et du raisin parasité par **Botrytis cinerea. C.R. Acad. Sci. Paris,** série D, 277, 975-978.

DUBERNET M. et RIBEREAU-GAYON P., 1974. (En préparation.)

GOUIRAND G., 1895. Sur la présence d'une diastase dans les vins cassés. **C.R. Acad. Sci. Paris,** 120, 887-889.

HAREL E. et MAYER A.M., 1971. Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes. **Phytochem.,** Vol. 10, 17-22.

IVANOV T., 1967 (a). Sur l'oxydation du moût de raisin. I - Activité de la polyphénoloxydase du raisin des cépages « Muscat rouge », « Dimiat », « Riesling » et « Aligoté ». **Ann. Technol. agric.,** 16, 1, 35-39.

IVANOV T., 1967 (b). L'oxydation biologique du moût de raisin. II - Etude comparée de l'anhydride sulfureux et de la bentonite en tant qu'inactivateurs de la polyphénoloxydase du moût de raisin. **Ann. Technol. agric.,** 16, 2, 81-88.

LABORDE J., 1896. Sur la casse des vins. **C.R. Acad. Sci. Paris,** 122, 1074-1076.

LOOMIS W.D. et BATTAILE J., 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. **Phytochem.,** Vol. 5, 423-438.

LOOMIS W.D., 1966. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. In **Methods in Enzymology,** Lowenstein J.M. Ed., Academic Press, New-York, Vol. XIII, 73, 555-563.

MALMSTRÖM BoG. et RYDEN L., 1968. The cooper-containing oxidases. In **Biological Oxidations,** Singer Ed., Interscience, 415-438.

MARTINIERE P. et SAPIS J.C., 1967. Essais de pressurage et de vinification sous atmosphère de gaz carbonique en bordelais. **Conn. Vigne Vin,** N° 2, 64-72.

MONTERODO G., 1969 (a). Ricerche sulla polifenolossidasi delle uve : I - Distribuzione ed evoluzione dell'attività enzymatica de frutto di diverse cultivars. **Industrie agrarie,** VII, 197-205.

MONTERODO G., 1969 (b). Ricerche sulla polifenolossidasi delle uve : II - Estrazione, purificazione e caratterizzazione dell'enzima. **Industrie agrarie,** VII, 259-267.

MONTERODO G. et CANTARELLI C., 1969 (c). Ricerche sulla polifenolossidassi delle uve : III - Stabilità ed inattivazione dell'enzima. **Industrie agrarie,** VII, 323-329.

POUX C., 1966. Polyphénoloxydases dans le raisin. **Ann. Technol. agric.,** 15, 2, 149-158.

POUX C., 1967. Enzymes oxydatifs dans le raisin. **C.R. Journée scient. C.N. Coord. Etud. Rech. Nutr. Alim. Paris.**