

Causes et conséquences de la consommation de l'oxygène par les moûts de raisin

par

M. DUBERNET et P. RIBÉREAU-GAYON

Causes and consequences of oxygen consumption by grape musts

S u m m a r y . — The occurrence of oxygen consumption by grape musts is shown. Its rate is measured by the use of a Clark oxygen electrode. This oxygen consumption is mainly due to enzymes which are a tyrosinase (catechol oxidase) from grape and a laccase from *Botrytis cinerea*. Both polyphenoloxidases catalyze the oxidation of must phenolic compounds by atmospheric oxygen. The evolution of the oxygen consumption by musts is studied in the course of the treatments they receive before their fermentation. The importance of the oxygen consumption by musts with regard to the technology of winemaking is discussed.

Introduction

On connaît l'importance technologique des questions relatives à l'oxydation des moûts et des vins, qui à l'extrême conduit à la casse oxydasique. On peut imaginer plusieurs possibilités pour aborder ce problème:

a. Etude des transformations chimiques des composés phénoliques, substrats de l'oxydation des moûts et des vins. Les travaux de SAPIE et RIBÉREAU-GAYON (1968) ont montré la difficulté de cet aspect du problème de l'oxydation.

b. Etude des polyphénoloxidases, enzymes qui catalysent l'oxydation biochimique des phénols aux dépens de l'oxygène de l'air. A côté de cette oxydation enzymatique, une oxydation purement chimique est possible. Il est admis que la première est la plus importante dans les moûts, mais la part respective de ces deux phénomènes n'a jamais été définie. Nous avons confirmé et précisé récemment (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 a) l'intervention de deux oxydases différentes présentée par LABORDE (1896):

1. La tyrosinase, encore appelée catécholase ou catéchol oxydase (o-diphénol: O₂ oxydoréductase, E.C. 1.10.3.1) provenant de la baie de raisin;

2. La laccase (p-diphénol: O₂ oxydoréductase, E.C. 1.10.3.2) sécrétée par *Botrytis cinerea* dans la baie.

Nous utilisons dans cette rédaction le terme «polyphénoloxidase» pour désigner indifféremment ces deux oxydases; certains auteurs l'utilisent exclusivement comme synonyme de tyrosinase.

c. Etude des conditions dans lesquelles les moûts et les vins consomment l'oxygène dissous; cette consommation est une manifestation de leurs capacités oxydatives.

La présente publication rapporte les résultats de nos recherches sur la consommation de l'oxygène par les moûts de raisin. Cette consommation étant pour l'essentiel due à la présence dans les moûts des polyphénoloxidases citées ci-dessus, il est nécessaire, pour la compréhension des résultats exposés, de résumer les connaissances actuelles sur ces enzymes.

La tyrosinase est abondante dans la baie de raisin (POUX 1966, IVANOV 1967, MONTEODORO 1969, HAREL et MAYER 1971) et passe en grande partie dans les moûts où elle existe sous deux formes: tyrosinase «particulaire» liée aux bourbes et tyrosinase

«soluble» en solution (TRAVERSO-RUEDA et SINGLETON 1973, DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 b).

Nous avons montré en outre que la tyrosinase peut, dans certains cas, se retrouver dans les vins blancs ou rosés, mais exclusivement lorsque les règles classiques de la vinification pour la protection des moûts et des vins contre les oxydations n'ont pas été appliquées. La tyrosinase présente en effet une stabilité réduite dans les vins et les moûts et possède en outre une grande sensibilité au SO_2 .

La laccase sécrétée dans la baie de raisin par le *Botrytis cinerea* se trouve en général en quantité plus faible que la tyrosinase. Cependant, sa meilleure stabilité, sa résistance plus importante au SO_2 et la propriété qu'elle possède d'être beaucoup plus active que la tyrosinase sur les principaux composés phénoliques du vin (anthocyanes et tanins) (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 a) font que cette enzyme se retrouve couramment dans les vins de vendanges pourries, dans lesquels elle représente un danger réel.

Ces faits expliquent que, dans les vins issus de vendanges pourries, les phénomènes d'oxydation soient plus importants, bien que la quantité initiale de polyphénoloxydases totales dans le raisin et le moût soit du même ordre que dans le cas d'une vendange saine. L'activité laccase, toujours relativement faible mais stable, est en quelque sorte masquée dans les raisins pourris et les moûts correspondants par l'activité tyrosinase, importante mais instable.

Matériel et Méthodes

Préparation des moûts

Les moûts étudiés ont été obtenus, à partir de raisins sains ou pourris issus de divers cépages rouges ou blancs du bordelais, par pressurage sous atmosphère d'azote, afin d'éviter toute oxydation au moment de leur préparation.

Mesure de la consommation de l'oxygène par les moûts

L'introduction d'oxygène dans les moûts se fait en les saturant par de l'air après les avoir amené à une température de 25 °C. La concentration en oxygène est alors voisine de 8 mg/l; celle-ci est mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène type OXI 39. La consommation de l'oxygène par le moût se traduit par une diminution de cette concentration au cours du temps, dont la vitesse est donnée par l'emploi d'un enregistreur couplé à l'électrode.

Les mesures de consommation de l'oxygène sont faites à 25 °C dans une cellule thermostatée dans laquelle plonge l'électrode à oxygène. Le moût, amené à une température de 25 °C, est placé dans la cellule après avoir été saturé par de l'air. La cellule pleine ne contient plus de phase gazeuse. Grâce à un système de pointeau, il est possible d'introduire dans la cellule, à tout moment de la mesure, une substance quelconque (SO_2 par exemple), sans apporter de l'oxygène au moût. Un barreau aimanté permet d'agiter le moût tout au long de la mesure, afin d'éviter un appauvrissement artificiel en oxygène au niveau de l'électrode, du à une légère consommation propre de cette électrode. Les résultats sont exprimés en mg d'oxygène consommés par litre de moût et par minute (mg O_2 /l/min).

Extraction de l'activité polyphénoloxydase contenue dans un moût

Afin de mesurer l'activité polyphénoloxydase contenue dans les moûts, qui traduit leur concentration en enzyme active, il est nécessaire d'en effectuer l'extraction afin d'éviter que les polyphénols du raisin n'interfèrent dans le dosage de cette activité réalisé à l'aide d'un substrat phénolique de référence.

Dans les moûts, l'activité laccase éventuelle, également une partie de l'activité tyrosinase sont en solution. Le reste de l'activité tyrosinase est lié aux bourbes (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 b). Cette activité «particulaire» peut être séparée des activités en solution par centrifugation du moût. Pour cette séparation 30 ml de moût sont centrifugés 1 min à 40 000 g à 2 °C:

a. Le surnageant contenant l'activité polyphénoloxydase en solution est additionné de 45 ml d'acétone à —20 °C, puis le mélange est centrifugé 12 min 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 6,2. Ce pH est choisi car il correspond à une bonne stabilité de la laccase et de la tyrosinase. Une nouvelle centrifugation de 5 min à 40 000 g permet d'éliminer les résidus insolubles. Le surnageant obtenu constitue l'extrait brut A du moût (laccase et tyrosinase en solution).

b. Le culot obtenu par centrifugation du moût, contenant l'activité tyrosinase particulaire, est lavé par 10 ml de tampon phosphate citrate 0,1 M, pH 6,2. Après une nouvelle centrifugation de 5 min à 40 000 g, le surnageant est écarté et le culot remis en suspension dans 3 ml de tampon phosphate citrate 0,1 M, pH 6,2. Cette suspension constitue l'extrait brut B du moût (tyrosinase particulaire).

Mesure de l'activité polyphénoloxydase extraite d'un moût

La mesure est effectuée à l'aide de l'électrode à oxygène servant à mesurer la consommation de l'oxygène par les moûts.

On introduit dans la cellule thermostatée à 25 °C, 10 ml d'une solution de méthyl-4 pyrocatechol 10 mM dans un tampon phosphate citrate 0,1 M, pH 4,75. Cette solution a été préalablement saturée par de l'air à 25 °C. Le pH choisi correspond au pH optimum d'activité de la laccase et de la tyrosinase. Le méthyl-4 pyrocatechol est oxydé par les deux enzymes (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 a). Après une minute de stabilisation, on ajoute au milieu 100 µl d'extrait A ou B du moût. La vitesse de consommation en oxygène du milieu réactionnel due à l'oxydation du substrat phénolique est enregistrée et donne une mesure de l'activité polyphénoloxydase contenue dans 100 µl d'extrait correspondant à 1 ml de moût. Les résultats sont exprimés en mg d'oxygène consommés par litre de milieu réactionnel, pendant une minute et pour une quantité d'extrait correspondant à 1 ml de moût (mg O₂/l/min/ml moût).

Lorsque les moûts étudiés sont issus de raisins sains, l'activité polyphénoloxydase correspond à la seule activité tyrosinase. Dans les moûts issus de raisins pourris, l'activité polyphénoloxydase correspond à la somme des activités tyrosinase et laccase. Ces deux activités peuvent être mesurées indépendamment à l'aide de substrats spécifiques (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 a).

Résultats

Consommation de l'oxygène par les moûts

La vitesse de consommation de l'oxygène par les moûts, qui traduit leur oxydabilité, est très variable. Des mesures effectuées sur 35 moûts différents donnent des valeurs s'étalant entre 0,5 et 4,6 mg O₂/l/min; la valeur moyenne est de 2 mg O₂/l/min. Dans ce cas, les 8 mg d'oxygène dissous par litre de moût, lors d'une saturation par de l'air à 25 °C, sont consommés en 4 minutes. Ce chiffre donne une idée de la très grande oxydabilité des moûts. A titre de comparaison, la vitesse moyenne de la consommation de l'oxygène par un vin blanc contenant 40 mg/l de SO₂ libre est, à 15 °C, de 1 mg par litre et par jour (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD 1961). A

25 °C, nous avons obtenu, sur un vin blanc sec, une consommation de 1,7 mg par litre et par jour. Dans certains cas particuliers de vins blancs, riches en tyrosinase parce que leur vinification a été conduite sans sulfitage et à l'abri complet de l'air (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 b), on observe une consommation de l'oxygène par le vin du même ordre que celles observées dans les moûts.

L'origine presque exclusivement enzymatique de l'oxydation des moûts est démontrée par chauffage de ceux-ci à une température de 90 °C pendant 3 minutes, sous azote afin d'éviter toute oxydation. Après chauffage, les activités tyrosinase et laccase ont disparu et la vitesse de consommation de l'oxygène par les moûts est en moyenne 150 fois plus faible que la vitesse initiale. Par exemple la vitesse de consommation de l'oxygène par un moût issu de raisins sains de Cabernet-Sauvignon qui était initialement de 2,95 mg O₂/l/min passe, après chauffage, à 0,018 mg O₂/l/min.

Cette consommation résiduelle, qui ne peut être éliminée par un chauffage plus long ou plus intense, a pour origine une oxydation chimique. Il est probable que, comme dans le cas des vins (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD 1961), un rôle essentiel soit joué, dans cette oxydation chimique, par les sels métalliques et en particulier par les sels de fer qui n'interviennent pas dans l'oxydation enzymatique.

Après destruction des enzymes par chauffage, il est possible de rétablir la vitesse initiale de consommation de l'oxygène en ajoutant, à un moût chauffé issu de raisins sains, un extrait de tyrosinase de raisin, en quantité suffisante pour obtenir une activité tyrosinase égale à l'activité initiale du moût. Il apparaît ainsi que l'oxydation des polyphénols catalysée par la tyrosinase du raisin est, dans le cas de vendanges saines, l'origine essentielle de la consommation de l'oxygène par les moûts.

Dans le cas de vendanges pourries, contrairement à ce que l'on pourrait penser, compte tenu de l'importance des phénomènes oxydatifs observés pour ce type de vendange, la vitesse de consommation de l'oxygène par les moûts est en général légèrement inférieure à la vitesse de consommation des moûts issus de raisins sains. Nous avons par exemple mesuré cette vitesse, sur deux moûts issus respectivement de raisins sains et de raisins pourris de cépage Sémillon, prélevés sur le même pied de vigne; elle est de 1,6 mg O₂/l/min pour le moût issu de raisins sains et de 1,1 mg O₂/l/min pour le moût issu de raisins pourris.

Le fait que la vitesse de consommation de l'oxygène ne soit pas plus grande dans le cas des moûts issus de raisins pourris peut avoir deux explications:

a. Une destruction, au cours des oxydations provoquées par l'attaque du *Botrytis cinerea* au niveau de la baie, d'une partie de la tyrosinase du raisin, qui n'est que partiellement remplacée par la laccase sécrétée par ce champignon. On observe en effet une diminution de l'activité polyphénoloxydase totale, somme des activités tyrosinase et laccase, dans les moûts issus de raisins pourris par rapport aux moûts issus de raisins sains. A titre d'exemple, les activités polyphénoloxydases totales des deux moûts de Sémillon cités ci-dessus sont de 8,8 mg O₂/l/min/ml de moût pour le moût issu de raisins sains et de 7,2 mg O₂/l/min/ml de moût pour le moût issu de raisins pourris.

b. Les mêmes oxydations s'accompagnent d'une destruction partielle des composés phénoliques oxydables du raisin, pouvant entraîner un appauvrissement en substrat des moûts qui en sont issus.

Enfin la comparaison d'un grand nombre de moûts a montré que leur vitesse de consommation de l'oxygène n'est pas directement proportionnelle à leur activité polyphénoloxydase (Tableau 1).

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'activité polyphénoloxydase n'est pas le seul facteur limitant de la vitesse de la consommation de l'oxygène; d'autres

Tableau 1

Activité tyrosinase et vitesse de consommation de l'oxygène de quatre moûts issus de raisins sains de Cabernet-Sauvignon provenant de différentes parcelles
Tyrosinase activity and rate of oxygen consumption of four musts from healthy Cabernet-Sauvignon berries from different plots

Moût n°	Vitesse de consommation de l'oxygène (mg O ₂ /l/min)	Activité tyrosinase (mg O ₂ /l/min/ml moût)		
		liée aux bourbes	en solution	totale
1	2,5	8,8	0,5	9,3
2	2,3	8,8	0,7	9,5
3	3,2	8,2	0,7	8,9
4	2,5	6,6	0,5	7,1

facteurs interviennent, dont le principal est probablement la quantité de substrats phénoliques présente dans ces moûts. On constate en effet que la vitesse de consommation de l'oxygène est beaucoup plus faible dans les moûts que dans une solution tampon de même pH, possédant la même activité polyphénoloxydase mais contenant un substrat phénolique en excès.

Evolution de la vitesse de la consommation de l'oxygène par les moûts au cours de leur oxydation

Si, après une première saturation suivie de la consommation de l'oxygène correspondant, un moût est à nouveau saturé en air, on constate un ralentissement de sa vitesse de consommation de l'oxygène. Cette vitesse continue de décroître au cours des saturations successives. On note cependant que cette diminution est plus rapide dans le cas des moûts issus de raisins sains que dans le cas de ceux issus de raisins pourris. Le Tableau 2 donne l'évolution de la vitesse de consommation de l'oxygène d'un moût issu de raisins sains et de deux moûts issus de raisins pourris de cépage Sémillon, provenant de la même vigne, au cours de saturations successives en air.

Ce résultat est en accord avec les faits suivants:

a. La tyrosinase est rapidement détruite au cours des oxydations qu'elle catalyse (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 b). Dans les mêmes conditions, la laccase présente une meilleure stabilité (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON, résultats non publiés).

b. La tyrosinase présente une spécificité plus étroite que la laccase; le nombre de substrats phénoliques susceptibles d'être oxydés est beaucoup plus faible pour la tyrosinase que pour la laccase. On peut donc observer, dans le moût au cours de son oxydation, l'épuisement des substrats de la tyrosinase, alors que ceux de la laccase restent encore en quantité suffisante.

Ainsi en présence de laccase, la consommation de l'oxygène par les moûts peut se prolonger plus longtemps car, d'une part le matériel enzymatique présent est plus stable, d'autre part l'épuisement des substrats phénoliques est plus long à obtenir.

Relation entre la consommation de l'oxygène par les moûts et leur brunissement

Au cours de leur oxydation, les moûts brunissent. Au départ, la couleur des moûts issus de raisins sains ou de raisins pourris (obtenus au laboratoire sous atmosphère d'azote) est sensiblement comparable. Il n'en va pas de même dans la

Tableau 2

Evolution de la vitesse de consommation de l'oxygène de trois moûts issus de raisins sains ou pourris, de cépage Sémillon, au cours de leur oxydation
 Evolution of the rate of oxygen consumption of three musts from healthy or rotten Sémillon berries in the course of their oxidation

Nombre de saturation en air	Moût de raisins sains (mg O ₂ /l/min)	Moûts de raisins pourris (mg O ₂ /l/min)	
		n° 1	n° 2
1	1,6	1,2	1
2	1	1,2	1
3	0,5	0,85	0,9
4		0,5	0,8
5			0,5

pratique; on observe en général des couleurs plus foncées pour les moûts issus de vendange pourrie que pour ceux issus de vendange saine. En fait, ceci est du essentiellement à une oxydation importante de la vendange au cours de son transport, qui intervient surtout dans le cas des raisins pourris, beaucoup plus fragiles, dont l'éclatement permet l'oxydation du jus. Ainsi pour les moûts issus de raisins sains, comme pour les moûts issus de raisins pourris, on observe entre la quantité d'oxygène consommée et la couleur du moût, les mêmes relations données dans le Tableau 3.

La couleur brun foncé, caractéristique des moûts cassés, est obtenue après consommation par les moûts d'une quantité d'oxygène correspondant à deux saturations par l'air à 25 °C (16 mg/l).

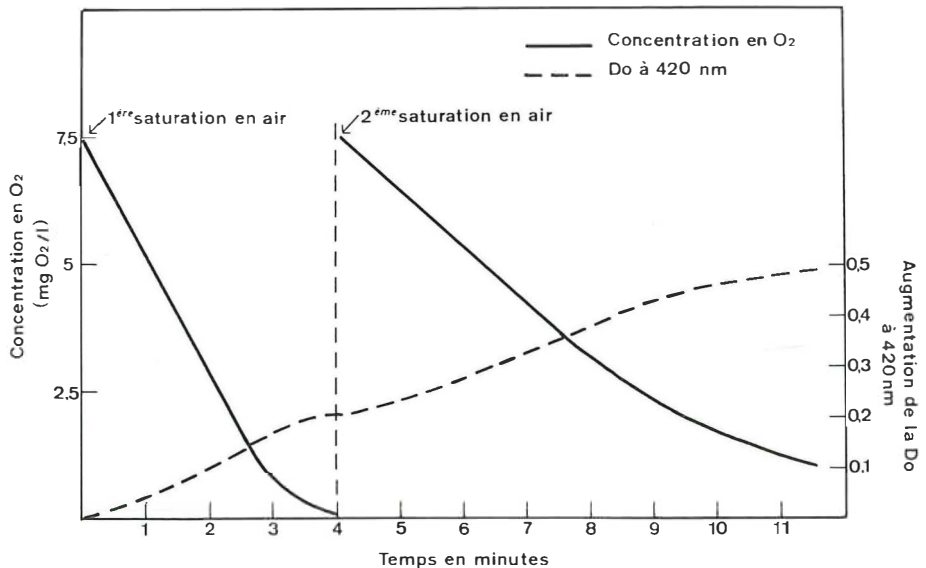


Fig. 1: Evolution de la couleur (densité optique à 420 nm) d'un moût en fonction de la quantité d'oxygène consommée au cours de son oxydation.

Evolution of the colour (optical density at 420 nm) of a must as a function of the amount of oxygen consumption in the course of its oxidation.

Dans le cas d'un moût centrifugé et donc limpide, il est possible de suivre parallèlement la consommation de l'oxygène et l'augmentation de la densité optique à 420 nm (Fig. 1). On constate que les deux phénomènes sont liés. On retrouve sur la Fig. 1, obtenue à partir d'un moût issu de raisins sains, la diminution de la vitesse de consommation de l'oxygène lors de la deuxième saturation du moût par de l'air (cf. Tableau 2).

Influence du sulfitage sur la consommation de l'oxygène par les moûts

Afin de préciser le rôle du SO_2 sur la consommation de l'oxygène par les moûts, nous avons utilisé le protocole expérimental suivant: Divers moûts, obtenus par pressurage sous azote à partir de raisins sains ou pourris de différents cépages, sont saturés par de l'air à 25 °C. Leur consommation de l'oxygène est enregistrée au cours du temps. Lorsque la quantité d'oxygène résiduelle arrive à une valeur donnée (5 mg/l), des doses variables de SO_2 sont additionnées au moût. Dans tous les cas, on obtient un arrêt de la consommation de l'oxygène (Fig. 2).

Si l'on considère le temps «t» qui s'écoule entre l'addition de SO_2 et l'arrêt de la consommation de l'oxygène, on constate qu'il est variable en fonction d'un certain nombre de facteurs:

- Dose de SO_2 utilisée.
- Vitesse initiale de la consommation de l'oxygène par le moût.
- pH du moût.
- Etat sanitaire de la vendange.

a. Variation du temps «t» en fonction de la dose de SO_2 utilisée

Plus la dose de SO_2 utilisée est importante, plus le temps «t» est court (Tableau 4).

b. Variation du temps «t» en fonction de la vitesse initiale de la consommation de l'oxygène par le moût

Pour une même dose de SO_2 ajoutée, le temps «t» varie suivant les moûts; il est d'autant plus long que la vitesse initiale de consommation de l'oxygène est élevée. Le Tableau 5 donne le temps «t» mesuré sur trois moûts possédant des vitesses initiales de consommation de l'oxygène différentes et ayant reçu une même addition de 40 mg/l de SO_2 .

Tableau 3

Relation entre la quantité d'oxygène consommée par les moûts et leur couleur
Correlation between the amount of oxygen consumption by musts and their colour

Quantité d'oxygène consommée (mg/l)	Couleur du moût
1ère saturation en air	
3	jaune très pâle
7	jaune pâle
2ème saturation en air	
10	jaune foncé
14	brun
16	brun foncé (cassé)

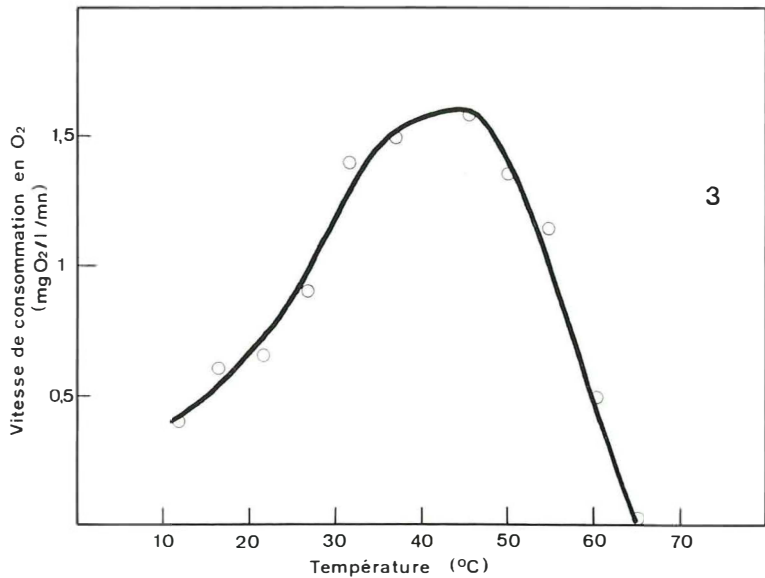
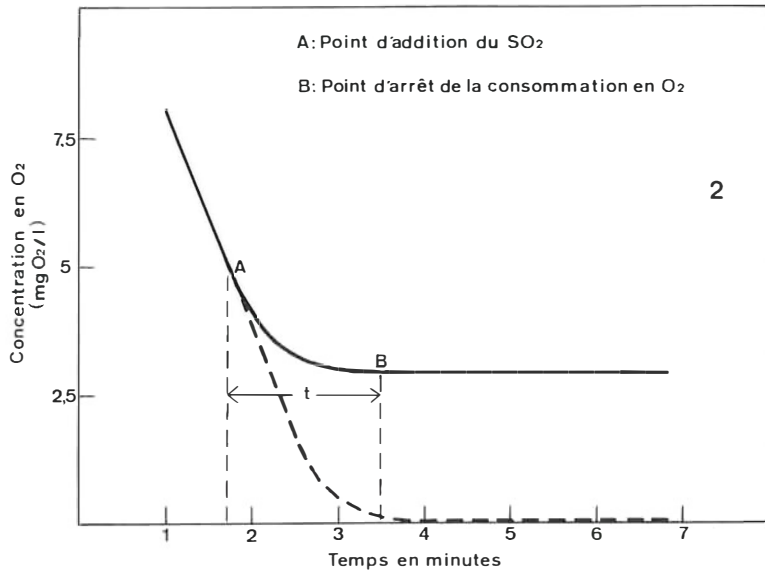


Fig. 2: Arrêt de la consommation de l'oxygène par les moûts à la suite de leur sulfitage. Stoppage of the oxygen consumption by musts as a result of their sulphiting.
 Fig. 3: Evolution de la consommation de l'oxygène par les moûts en fonction de la température.

Evolution of the oxygen consumption by musts as a function of temperature.

c. Variation du temps «t» en fonction du pH du moût

Si l'on ajuste le pH d'un moût à différentes valeurs avec NaOH ou H_2SO_4 , on constate que, pour une même dose de SO_2 (45 mg/l dans l'exemple choisi), le temps

Tableau 4

Variation du temps «t» d'arrêt de la consommation de l'oxygène, en fonction de la dose de SO₂ ajoutée pour deux moûts issus de raisins de cépage Ugni-Blanc
 Variation of the time "t" for stoppage of the oxygen consumption as a function of the SO₂ amount added to two Ugni-Blanc musts

Dose de SO ₂ (mg/l)	«t» en minutes et secondes	
	moût n° 1	moût n° 2
10	6 min	
20	3 min 15 s	
30	1 min 30 s	
40		3 min 25 s
60		2 min
80	1 min 15 s	
100		1 min 15 s

Tableau 5

Variation du temps «t» d'arrêt de la consommation de l'oxygène en fonction de la vitesse initiale de consommation de l'oxygène des moûts (dose de SO₂ : 40 mg/l)
 Variation of the time "t" for stoppage of the oxygen consumption as a function of the initial rate of oxygen consumption of musts (SO₂ : 40 mg/l)

Moût n°	Vitesse initiale de consommation de l'oxy- gène (mg O ₂ /l/min)	«t» en minutes et secondes
1	0,31	0 min 45 s
2	1,30	2 min 25 s
3	4,00	3 min 25 s

Tableau 6

Variation du temps «t» d'arrêt de la consommation de l'oxygène en fonction du pH d'un même moût
 Variation of the time "t" for stoppage of the oxygen consumption as a function of the pH of the same must

pH	«t» en minutes et secondes
3,00	2 min 45 s
3,35	3 min 15 s
3,60	3 min 30 s
3,90	4 min

«t» est d'autant plus long que le pH est élevé (Tableau 6). Ce résultat est en accord avec l'évolution de la quantité de «SO₂ actif» dans les moûts et les vins en fonction du pH. Celle-ci est d'autant plus faible que le pH est élevé. On pourrait d'autre part penser que l'augmentation du temps «t», liée à une augmentation de pH, est due à une augmentation de la vitesse initiale de consommation de l'oxygène par le moût. En fait nous avons constaté que cette vitesse est peu influencée par les variations de pH, telles qu'elles existent dans les moûts.

d. Variation du temps «t» en fonction de l'état sanitaire de la vendange

Dans le cas de moûts issus de vendange pourrie, le temps «t», mesuré pour une addition de SO_2 donnée, est toujours plus important que dans le cas de moûts de vendange saine possédant une vitesse initiale de consommation de l'oxygène du même ordre. Ce temps est par exemple, pour un moût issu de raisins pourris de cépage Sémillon et pour une dose de SO_2 de 30 mg/l, de 9 minutes, alors qu'il n'est que de 2 minutes pour un moût issu de raisins sains, prélevées sur le même pied de vigne, possédant une vitesse initiale de consommation de l'oxygène du même ordre et recevant une même dose de SO_2 .

Le mécanisme d'action du SO_2 , aboutissant à l'arrêt de la consommation de l'oxygène par les moûts semble complexe. Le SO_2 exerce sur la tyrosinase et aussi sur la laccase, une action de destruction (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 b). Cependant, cette destruction n'est pas totale pour les doses de SO_2 utilisées dans la pratique. L'arrêt de la consommation de l'oxygène par les moûts traduit alors une inhibition de leur activité polyphénoloxydase résiduelle. Il est possible que cette inhibition résulte de combinaisons formées par le SO_2 avec les substrats phénoliques. D'autre part, le SO_2 intervient certainement par son effet réducteur; ainsi, au moment de l'addition de SO_2 dans un moût en voie d'oxydation, on observe un éclaircissement de la couleur du moût qui correspond à la rétrogradation en polyphénols, des quinones résultant de leur oxydation.

Notons enfin que dans le cas de moûts obtenus en fin de pressurage, la consommation de l'oxygène peut se continuer lentement après le sulfitage.

Influence du débourage sur la consommation de l'oxygène par les moûts

Dans les moûts, la laccase et une partie de la tyrosinase se trouvent en solution; le reste de la tyrosinase est lié aux bourbes (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 b). Lors du débourage des moûts, cette fraction de tyrosinase est éliminée. Le Tableau 7 montre que cela entraîne une diminution de la vitesse de consommation de l'oxygène par le moût.

Influence de la température sur la consommation de l'oxygène par les moûts

Une courbe type indiquant la variation de la vitesse de consommation de l'oxygène par les moûts en fonction de la température est donnée dans la Fig. 3. Le maximum, obtenu ici pour une température de 45 °C, peut varier de 35 à 45 °C environ suivant les moûts. De même la température pour laquelle la consommation de l'oxygène est arrêtée n'est pas toujours exactement de 65 °C.

Tableau 7

Influence du débourage sur la vitesse de consommation de l'oxygène de quatre moûts
Influence of racking on the rate of oxygen consumption of four musts

Moût n°	Vitesse de consommation de de l'oxygène (mg O_2 /l/min)	
	Avant débourage	Après débourage
1	1,8	1
2	2	1,25
3	2,6	1,75
4	1	0,7

La consommation de l'oxygène par les moûts de raisin

Le fait important est la très rapide augmentation de la vitesse de consommation de l'oxygène dans la zone des températures rencontrées dans la pratique des vinifications. Dans l'exemple choisi, cette vitesse est trois fois plus élevée à 30 qu'à 12 °C.

Discussion et Conclusions

Les résultats exposés montrent que tous les moûts ont la capacité de consommer l'oxygène moléculaire dissous qu'ils peuvent contenir. Cette consommation se fait avec une grande vitesse; elle correspond à une oxydation enzymatique des composés phénoliques due à l'intervention de la tyrosinase (catéchol oxydase) du raisin et de la laccase de *Botrytis cinerea*. En dehors des vinifications réalisées totalement à l'abri de l'air, les moûts trouvent l'occasion de consommer des quantités importantes d'oxygène au cours des manipulations précédant leur départ en fermentation. Par comparaison avec des moûts obtenus au laboratoire à l'abri complet de l'air, la couleur des moûts obtenus par pressurage de raisins entiers dans un pressoir horizontal, permet de supposer qu'ils ont consommé environ 15 mg d'oxygène par litre. Cela correspond à la quantité d'oxygène fixée par le moût lorsqu'il est saturé deux fois par de l'air à 25 °C. Ainsi, lors de la préparation des moûts, si des précautions suffisantes ne sont pas prises, et parmi celles-ci un sulfitage rapide est la plus efficace, les risques d'une oxydation profonde sont certains.

Ces risques sont encore plus grands dans le cas des moûts issus de vendange pourrie bien qu'ils ne consomment pas plus vite l'oxygène dissous. En effet, la plus grande stabilité de la laccase spécifique de *Botrytis cinerea* fait que ces moûts peuvent consommer de l'oxygène, sinon plus vite, du moins plus longtemps que les moûts issus de vendanges saines. D'autre part, la laccase pouvant attaquer un beaucoup plus grand nombre de substrats phénoliques que la tyrosinase, il est permis de penser que l'oxydation des moûts par cette enzyme est plus profonde. En somme, la gravité des oxydations dues à la laccase des raisins pourris ne réside pas dans une plus grande vitesse d'oxydation, mais, d'une part dans la stabilité des phénomènes liée à la stabilité de l'enzyme, d'autre part dans le plus grand nombre de composés phénoliques du moût et du vin dégradés par cette enzyme.

Ainsi nos résultats expliquent le rôle néfaste, à l'égard de la qualité des vins, des oxydations profondes des moûts, catalysées par les polyphénoloxydases. Mais, ils montrent aussi qu'une oxydation limitée, du type de celle obtenue par pressurage du raisin sain entier en pressoir horizontal, améliore au contraire la stabilité ultérieure du vin, sans nuire à ses qualités organoleptiques (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON 1973 b). En effet, de telles oxydations, d'une part détruisent la tyrosinase peu résistante et d'autre part font disparaître une partie des substrats phénoliques de l'oxydation. On explique ainsi les difficultés pratiques rencontrées dans l'élaboration de vins issus de moûts préparés et mis à fermenter à l'abri complet de l'air; ces vins, exempts d'oxydation, sont très sensibles à une oxydation ultérieure, car ils contiennent intégralement la tyrosinase et les substrats phénoliques du moût.

Un résultat important a été la démonstration du mécanisme de l'arrêt de la consommation de l'oxygène des moûts par le sulfitage. Le temps nécessaire, pour obtenir cet arrêt après le sulfitage, varie suivant les moûts en fonction de la dose de SO₂ employée, de leur vitesse de consommation initiale de l'oxygène, de leur pH, de l'état sanitaire de la vendange dont ils sont issus. Une conséquence pratique de ce phénomène est la possibilité pour les moûts de conserver de l'oxygène dissous au moment de leur mise en fermentation, soit que tout l'oxygène dissous lors de leur préparation n'ait pas été consommé avant sulfitage, soit que les manipulations du moût ultérieures au sulfitage aient entraîné une nouvelle dissolution d'oxygène.

L'existence de cet oxygène dissous permet de proposer une explication de l'effet activateur bien connu d'un sulfitage léger sur la fermentation alcoolique: les levures trouvent dans les moûts sulfités l'oxygène dissous qui leur est nécessaire pour leur phase de multiplication, alors que dans les moûts non sulfités, cet oxygène est rapidement et complètement éliminé par oxydation enzymatique des composés phénoliques.

Nous avons par ailleurs confirmé le rôle favorable du débourbage pour limiter les phénomènes oxydatifs; cette opération diminue la consommation de l'oxygène par le moût, en diminuant le taux de polyphénoloxydases par l'élimination de la fraction particulaire de la tyrosinase.

Enfin, la consommation de l'oxygène par les moûts ne semble pas affectée par l'acidité, tout au moins dans la limite des pH naturels des moûts. Par contre, comme tous les phénomènes enzymatiques, elle est très sensible à la température; sa vitesse est trois fois plus grande à 30 °C qu'à 10 °C et diminue au-dessus de 40 °C, lorsqu'il y a inactivation, par la chaleur, de la protéine enzymatique.

Résumé

La consommation de l'oxygène par les moûts est mise en évidence et sa vitesse mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène. Cette consommation est essentiellement d'origine enzymatique et fait intervenir la tyrosinase (catéchol oxydase) du raisin et la laccase de *Botrytis cinerea*, polyphénoloxydases catalysant l'oxydation des composés phénoliques du moût à partir de l'oxygène moléculaire. L'évolution de la consommation de l'oxygène par les moûts est suivie au cours de leur oxydation, au cours de traitements préfermentaires du moût tels que le sulfitage et le débourbage et en fonction de la température. Les conséquences de ces résultats sur la technologie de la production des vins sont discutées.

Bibliographie

- DUBERNET, M. et RIBÉREAU-GAYON, P., 1973 a: Les «polyphénoloxydases» du raisin sain et du raisin parasité par *Botrytis cinerea*. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 277 D, 975—978.
 — — — — —, 1973 b: Présence et signification dans les moûts et les vins de la tyrosinase du raisin. Conn. Vigne Vin (Talence) 7, 283—302.
 HAREL, E. and MAYER, A. M., 1971: Partial purification and properties of catechol oxidase in grapes. Phytochemistry (Oxford) 10, 17—22.
 IVANOV, T., 1967: 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. (Paris) 16, 35—39.
 LABORDE, J., 1896: Sur la casse des vins. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 122, 1074—1076.
 MONTEODORO, G., 1969: Ricerche sulla polifenolossidasi delle uve: I. Distribuzione ed evoluzione dell'attività enzimatica de frutto di diverse cultivars. Industrie Agrarie 7, 197—205.
 POUX, C., 1966: Polyphénoloxydases dans le raisin. Ann. Technol. Agric. (Paris) 15, 149—158.
 RIBÉREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E., 1961: Traité d'Oenologie 2, p. 184, Bérange Paris.
 SAPIE, J.-C. et RIBÉREAU-GAYON, P., 1968: Etude du brunissement des vins blancs. I. Transformation des composés phénoliques au cours du brunissement. Conn. Vigne Vin (Talence) 4, 323—348.
 TRAVERSO- RUEDA, S. and SINGLETON, V. L., 1973: Catecholase activity in grape juice and its implications in winemaking. Amer. J. Enol. Vitic. 24, 103—109.

Ein-gegangen am 5. 3. 1974

Prof. Dr. P. RIBÉREAU-GAYON
 Univ. de Bordeaux II
 Inst. d'Oenologie
 351 Cours de la Libération
 Talence 33 405
 France