

Incidence d'une activité glucanasique exogène sur le devenir des macromolécules levuriennes du vin

par

M. GUILLOUX-BENATIER, B. PUECH et M. FEULLAT

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin "Jules Guyot", Université de Bourgogne, Dijon, France

R é s u m é : L'addition d'une préparation enzymatique contenant des activités pectinasiques et β (1→3) glucanasiques sur les lies levuriennes est testée en milieu vin et en milieu synthétique. Son intérêt est double: hydrolyse des macromolécules présentes initialement dans le milieu et accélération de la désorganisation du réseau glucanes de la paroi levurienne. Ceci se traduit par une augmentation de la libération de mannoprotéines d'environ 50 kDa.

Influence of exogenous glucanase activity on the yeast macromolecules in wine

S u m m a r y : The addition of an enzymatic preparation containing pectinase and β (1→3)glucanase activities on yeast lees was tested in wine and a synthetic medium. We observed the hydrolysis of the macromolecules which were present initially in the medium and an acceleration of hydrolysis of cell wall glucans. The liberation of mannoproteins about 50 kDa was increased.

K e y w o r d s : β -(1→3)-glucanase, glucans, mannoproteins, yeast lees.

Introduction

Dans le moût en fermentation, la libération des macromolécules glucidiques d'origine levurienne est le fait de cellules vivantes et dépend grandement de la composition initiale du milieu (GUILLOUX-BENATIER *et al.* 1995, 1998). Ceci est lié notamment à une modification de la porosité pariétale (BOIVIN *et al.* 1998). Au cours de l'autolyse des levures après la fermentation alcoolique, on observe un relargage important de polysaccharides solubles par dégradation enzymatique des constituants de la paroi (CHARPENTIER *et al.* 1986; FEULLAT *et al.* 1989). Cette dernière est constituée en majeure partie de polysaccharides et de glycoprotéines (80-90 % de son poids sec): glucanes (30-60 %), mannoprotéines (40 %) et chitine (1-2 %). Les glucanes liés en majeure partie en β (1→3) occupent la partie interne de la paroi et sont ainsi responsables de sa rigidité et de son intégrité structurale. Les mannoprotéines forment une couche à la périphérie de la paroi (SCHREUDER *et al.* 1996). Au cours de l'autolyse, on observe une hydrolyse précoce du glucane par les enzymes levuriennes (exo et endo β (1→3) glucanasés) ce qui permet alors la libération des mannoprotéines dans le milieu extérieur (FREYSSINET 1988).

Or, ces macromolécules glucidiques jouent un rôle important au cours de l'élaboration du vin: interactions avec les composés d'arôme (LUBBERS *et al.* 1994), participation à la notion de gras et de charnu des vins (FERRARI et FEULLAT 1988), rôle de protection vis à vis des précipitations tartriques (LUBBERS *et al.* 1993; MOINE-LEDOUX *et al.* 1997) et vis

à vis de la casse protéique (WATERS *et al.* 1993) notamment par les mannoprotéines. Compte tenu du rôle important de ces macromolécules d'origine pariétale en oenologie, il peut s'avérer intéressant d'augmenter leur concentration par intensification des phénomènes d'autolyse grâce à des glucanasés exogènes. Nous avons ainsi testé l'addition d'une préparation commerciale, utilisée pour améliorer la clarification grâce à son action pectinasique et glucanasique, dans des vins rouges ou blancs au cours d'un élevage sur lies et dans un milieu synthétique enrichi ou non en lies levuriennes. Ceci nous permettra de mieux définir l'influence de cette préparation enzymatique sur le devenir des macromolécules glucidiques et glycoprotéines (teneur et composition).

Matériel et Méthodes

Préparation enzymatique : La préparation utilisée est Vinoflow G[®] fournie par la Société Novo Nordisk (Dittingen, Switzerland). Cette préparation possède une forte activité β (1→3) glucanasique dont le pH optimum et la température optimale, déterminés au laboratoire, sont respectivement de 5 et 50 °C. Différentes activités enzymatiques présentes dans cette préparation ont été recherchées en se plaçant dans des conditions œnologiques: moût de raisin ou tampon hydroalcoolique pH 3, éthanol 10 % (v/v), 20 °C (Tab. 1). Les activités détectées montrent que Vinoflow est capable d'hydrolyser les pectines et les glucanes présents

Tableau 1

Activités enzymatiques de Vinoflow mesurées en conditions œnologiques

Enzymatic activities of Vinoflow under enological conditions

Activité recherchée	Substrat utilisé	Dosage réalisé	Activité mesurée
β (1-3) glucanasique	Laminarine (Sigma)	Glucose (Glu) (enzymologie)	114 ng Glu·h ⁻¹ ·g ⁻¹ protéine
mannanasique	Mannane (Sigma)	Sucres réducteurs (colorimétrie)	0
protéolytique	Hémoglobine dénaturée (Merck)	Fonctions NH ₂ (colorimétrie)	0
pectinasique	- Moût de raisin Chardonnay - Colloïdes de raisin Chardonnay	Ac. galacturonique (Gal) (colorimétrie)	124 mg Gal·h ⁻¹ ·g ⁻¹ protéine 79 mg Gal·h ⁻¹ ·g ⁻¹ protéine

dans le milieu. Par contre, dans les conditions testées, elle ne présente aucune activité mannanasique ou protéolytique.

Protocoles des essais : L'essai réalisé dans les conditions de la pratique porte sur un vin rouge de Pinot noir (Hautes-Côtes-de-Nuits, 1997). En fin de fermentation alcoolique, après décantation d'une semaine, quatre lots ont été constitués: - un lot L conservé sur lies fines sans bâtonnage, - un lot LB conservé sur lies fines avec bâtonnage, - un lot LE identique au lot L mais additionné de la préparation enzymatique (5 g·hl⁻¹), - un lot LBE identique au lot LB mais additionné de la préparation enzymatique (5 g·hl⁻¹). Chaque lot correspond à trois fûts de chêne (228 l). Le bâtonnage est hebdomadaire; l'expérimentation dure 14 semaines (Essai 1).

Pour les essais réalisés au laboratoire, nous avons utilisé un vin blanc de Chardonnay provenant du Centre Expérimental de Viticulture et d'Œnologie de l'Université de Bourgogne. Ce vin (pH 3) en fin de fermentation alcoolique a été centrifugé (4000 g, 4 °C, 20 min). Les lies ont été lavées trois fois avec NaCl 155 mM. Pour l'essai en milieu vin, nous avons constitué les quatre lots suivants (bouteilles de 0,75 l): - Vin témoin, - Vin + préparation enzymatique (40 mg·l⁻¹), - Vin + lies (16 g·l⁻¹), - Vin + lies (16 g·l⁻¹) + préparation enzymatique (40 mg·l⁻¹). L'expérimentation dure 8 semaines à 15 °C (Essai 2). Pour l'essai en milieu synthétique (éthanol: 10 % (v/v), acide tartrique: 4 g·l⁻¹, acide malique: 3 g·l⁻¹, acide acétique: 0,1 g·l⁻¹, K₂SO₄: 0,1 g·l⁻¹, MgSO₄·7 H₂O: 25 mg·l⁻¹, pH ajusté à 3 avec KOH 5 M), deux lots (bouteilles de 0,75 l) ont été constitués de la manière suivante: - Milieu synthétique + lies (16 g·l⁻¹), - Milieu synthétique + lies (16 g·l⁻¹) + préparation enzymatique (40 mg·l⁻¹). L'expérimentation dure 8 semaines à 15 °C (Essai 3).

Obtention et teneur en macromolécules : Après centrifugation du milieu (15 min, 7000 g), la concentration en macromolécules du surnageant est obtenue soit par microprécipitation à l'éthanol et dosage du glucose au phénol sulfurique (DUBOIS *et al.* 1956) pour les essais 1 et 3, soit par macroprécipitation (USSEGLIO-TOMASSET 1976) et pesée après séchage à l'éther pour l'essai 2.

Analyse des macromolécules : La détermination de la composition des macromolécules, iso-

lées par macroprécipitation à l'éthanol, est réalisée par hydrolyse acide. Les oses constitutifs des polysaccharides libérés quantitativement sont rendus volatils par dérivation en acétate d'alditol selon le protocole de BLAKENEY *et al.* (1983). Les hydrolysats repris dans 1 ml de NH₄OH 1M contenant 1 mg·ml⁻¹ d'étalon interne (myo-inositol) et 1 ml de NaBH₄ à 2 % proviennent de 10 mg de macromolécules. Après peracétylation par 2 ml d'anhydride acétique en présence de 200 µl de 1-méthyl imidazole, les acétates d'alditol sont extraits par 1 ml de chloroforme. Ils sont séparés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire (RTX 2330, 30 m de longueur et 0,32 mm d.i.) sous un courant gazeux de N₂ (5 ml·min⁻¹), H₂ (30 ml·min⁻¹), air (300 ml·min⁻¹). La température de la colonne est programmée de 165 °C à 265 °C à 5 °C·min⁻¹. Le chromatographe en phase gazeuse (Chrompack modèle CP 9001) est équipé d'un injecteur solide maintenu à 265 °C, d'un détecteur à ionisation de flamme (280 °C) et d'un intégrateur (Shimadzu C-R3A). La calibration a été réalisée préalablement avec des standards (Sigma).

Le fractionnement des macromolécules glucidiques (4 mg·ml⁻¹) est réalisé par chromatographie d'exclusion-diffusion basse pression sur une colonne de Sephacryl S 300. Le domaine de fractionnement de ce gel se situe entre 2x10³ Da et 4x10⁵ Da. Le dispositif utilisé présente les caractéristiques suivantes: longueur de colonne de 72,5 cm (V_T = 356 ml, V_O = 143 ml) - élution descendante par NaCl 0,1 M sous un débit de 40 ml·h⁻¹ - volume injecté de 3 ml d'une solution de macromolécules à 4 mg·ml⁻¹ - détection en sortie de colonne des sucres par réfractométrie (Spectra physics modèle SP 8430). L'étalonnage de la colonne est réalisée à l'aide de dextrans standards (Bleu dextran, T150, T70, T40, T9,3 et T5).

Dosage du glucose libéré dans le milieu extérieur : par méthode enzymatique (Kit Boehringer Mannheim, Allemagne).

Résultats et Discussion

Influence d'une addition de glucanase sur la teneur en polysaccharides

neutres d'un vin rouge au cours de son élevage sur lies fines (Essai 1): Au cours de l'élevage, les vins conservés sur lies fines (L) s'enrichissent régulièrement en polysaccharides neutres grâce à l'auto-lyse des levures, avec une amplification du phénomène par la remise régulière en suspension des lies ou bâtonnage (LB) (Fig. 1). Pour les lots additionnés de la préparation enzymatique, il est observé une très forte baisse de la teneur en macromolécules des vins rouges que les lots soient bâtonnés (LBE) ou non bâtonnés (LE). Ceci indique que cette préparation enzymatique a une réelle efficacité dans le vin (pH 3,2, 13 % d'éthanol et 15 °C de conservation). Elle est capable d'hydrolyser les macromolécules osidiques du milieu puisque la concentration en polysaccharides neutres diminue très significativement trois semaines après son addition. Le réenrichissement observé après 14 semaines correspond vraisemblablement à une libération de mannoprotéines dans le vin.

Influence d'une addition de glucanase sur la teneur en macromolécules d'un vin blanc enrichi ou non en lies levuriennes (Essai 2): Cet essai est réalisé pour voir si la préparation enzymatique est capable de dégrader le réseau de glucanes de la paroi des levures et permettre ainsi une libération accrue de mannoprotéines dans le vin. Après 8 semaines à 15 °C, la concentration en macromolécules présentes dans le vin et la composition en glucose et mannose de celles-ci ont été déterminées dans les 4 lots (Tab. 2).

Dans le vin sans lies, une addition de Vinoflow a un effet très important sur la teneur en macromolécules. Ceci se traduit par une diminution d'environ 54 % de la concentration en macromolécules du vin (142 mg·l⁻¹ pour 309 mg·l⁻¹) du fait de son action pectinasique et glucanasique. En présence de la préparation enzymatique le rapport man/glu augmente de 1,9 à 2,9. Cette augmentation est due essentiellement à une diminution importante de la fraction glucose des macromolécules suite à l'hydrolyse des glucanes d'origine levurienne du vin.

Dans le vin additionné de lies, la présence de la préparation enzymatique se traduit également par une baisse de la teneur en macromolécules d'environ 8,5 % (268 mg·l⁻¹ pour 293 mg·l⁻¹). Cette diminution est beaucoup plus faible dans ce cas car les lies, du fait de la présence de glucanases levuriennes, sont elles-mêmes capables de relarguer des macromolécules pariétales. Mais on retrouve aussi une nette

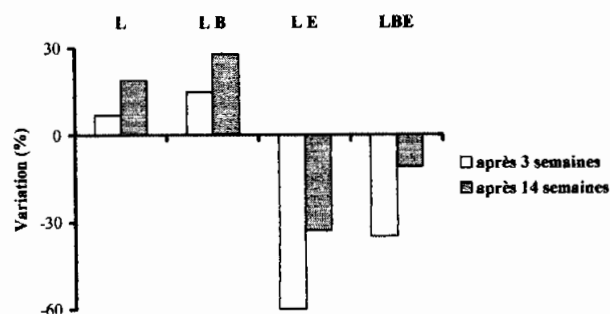


Fig. 1 : Variation au cours de l'élevage de la teneur en polysaccharides neutres (%) d'un vin rouge conservé sur lies (L) avec ou sans bâtonnage (B) et additionné ou non de Vinoflow (E) (Essai 1).

Changes of the neutral polysaccharide content (%) of red wine during ageing, kept on the lees (L) with or without stirring of the lees (B) and with or without addition of Vinoflow (E) (experiment 1).

augmentation du rapport man/glu de 1,9 à 2,6 due ici aussi principalement à une diminution de la fraction glucose des macromolécules.

Afin de mieux comprendre comment agit cette préparation commerciale sur les macromolécules, nous avons réalisé un fractionnement de celles-ci sur Sephacryl. Dans le cadre de l'essai milieu vin + lies (Fig. 2 b), en présence de Vinoflow nous constatons une hydrolyse plus ou moins complète de deux fractions de haut poids moléculaires (>400 kDa et 270 kDa) et en parallèle une augmentation d'une fraction de plus faible poids moléculaire (46 kDa). Le même résultat est observé dans le milieu vin en l'absence de lies (Fig. 2 a), mais les fractions concernées par l'hydrolyse ne sont pas les mêmes. Nous observons une disparition presque complète de la fraction exclue (>400 kDa), une disparition importante de la fraction 100 kDa et une augmentation en composés de plus faible masse moléculaire: 46 kDa et 12 kDa. Afin de vérifier si l'hydrolyse des glucanes levuriens peut être complète, le dosage du glucose libéré éventuellement dans le vin sous l'action de la β (1→3) glucanase a été réalisé dans les quatre lots après 8 semaines de contact. Le vin témoin en contient 77±3 mg·l⁻¹, le vin additionné de Vinoflow 410±12 mg·l⁻¹, le vin enrichi en lies 310±9 mg·l⁻¹ et le vin enrichi en lies et additionné de Vinoflow 540±16 mg·l⁻¹. L'augmentation en glucose dans les trois lots par rapport au vin témoin sans lies est nette. Pour le vin élevé sur lies, cette libération de glucose dans le milieu est le fait des glucanases levuriennes. Mais que ce soit pour le vin témoin sans lies ou

Tableau 2

Macromolécules: concentration et composition en monosaccharides

Macromolecule concentration and monosaccharide composition

Milieu vin blanc	Concentration (mg·l ⁻¹)	Glucose (mg·10 mg ⁻¹ macromolécules)	Mannose	Rapport (Mannose/Glucose)
- lies	309 ± 9	2,40	4,52	1,9
- lies + Vinoflow	142 ± 4	1,76	5,16	2,9
+ lies	293 ± 9	2,88	5,44	1,9
+ lies + Vinoflow	268 ± 8	1,84	4,80	2,6

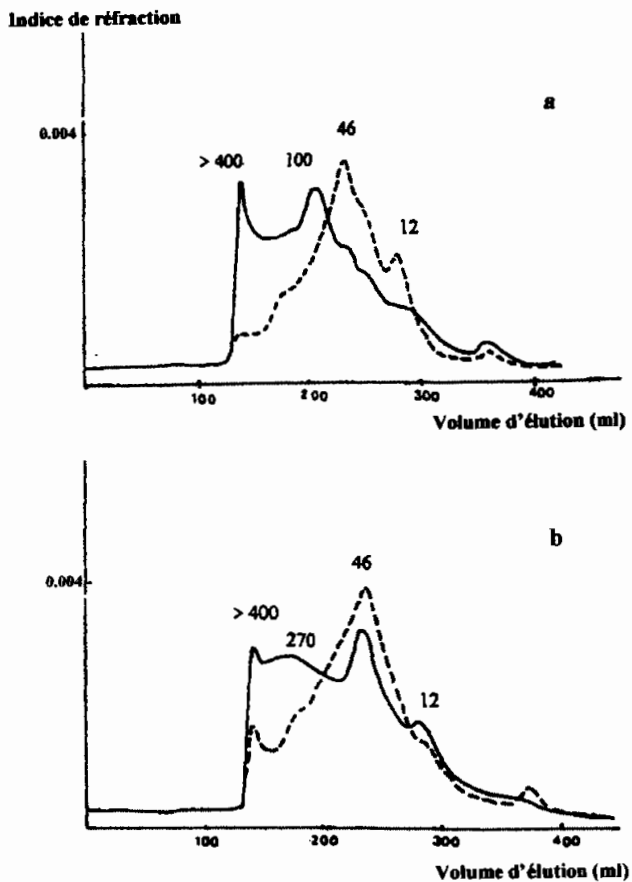


Fig. 2 : Chromatogrammes sur Sephacryl S 300 des macromolécules libérées dans le vin blanc conservé sans lies (a) ou avec lies (b), avec (---) et sans (—) addition de la préparation enzymatique (masses moléculaires exprimées en kDa) (Essai 2).

Chromatograms of macromolecules liberated in white wine in the absence (a) or presence (b) of yeast lees, with (---) or without (—) enzymatic preparation (molecular weight in kDa) (experiment 2).

pour le vin élevé sur lies, l'addition de la préparation enzymatique augmente fortement le taux de libération de glucose (410 pour 77 mg·l⁻¹ et 540 pour 310 mg·l⁻¹).

Cette préparation serait donc capable d'hydrolyser les glucanes présents dans le vin en fractions de masse moléculaire plus faibles. Elle semble même susceptible, en conditions œnologiques, d'hydrolyser les glucanes en monomères puisque nous observons une libération de molécules de glucose dans le vin après 8 semaines d'expérimentation.

Action de la glucanase sur les parois de levures (Essai 3) : Afin de pouvoir confirmer les résultats précédents, les mêmes essais ont été conduits cette fois-ci en milieu totalement synthétique pour ne s'intéresser qu'à l'action de la préparation enzymatique sur les lies. Après 8 semaines d'expérimentation à 15 °C, les lots sont centrifugés et les macromolécules sont séparées du milieu et analysées (Tab. 3). Les résultats obtenus confirment que la préparation enzymatique est susceptible d'agir sur les constituants pariétaux des levures à 15 °C. En effet, nous avons mesuré une augmentation très significative de la teneur en polysaccharides neutres libérés dans le milieu extérieur sous l'action de la glucanase (+177 %). En milieu synthétique, nous constatons également une augmentation du rapport man/glu dans le milieu additionné de Vinoflow de 1,3 à 3,1. Ceci est dû à la fois à la diminution de la fraction glucose et à l'augmentation de la fraction mannose. La proportion plus élevée de mannose dans les macromolécules libérées à partir de lies par la préparation enzymatique indique clairement qu'il s'agit de mannoprotéines d'origine pariétale. Cette glucanase permettrait donc l'hydrolyse du réseau de glucanes de la paroi levurienne, ce qui se traduit alors par une libération de mannoprotéines dans le milieu extérieur. Sous l'action de la préparation enzymatique, la fraction 50 kDa augmente en effet de façon très importante (Fig. 3). De plus, la possibilité d'hydrolyser en oses simples les glucanes de levures existe bien puisque la concentration en glucose augmente très nettement dans le milieu hydroalcoolique après les 8 semaines d'expérimentation en présence de la glucanase. En effet en l'absence de glucanase, les lies libèrent seulement 16 ± 1 mg·l⁻¹ de glucose dans le milieu alors que sous l'action de cette préparation enzymatique, on en obtient 191 ± 6 mg·l⁻¹.

Conclusion

L'influence d'une addition de Vinoflow sur les macromolécules d'un vin a été déterminée en conditions œnologiques. Sans addition de lies au milieu vin, la préparation enzymatique testée hydrolyse les macromolécules initialement présentes (pectines et glucanes de levures libérés pendant la fermentation alcoolique) en composés de plus faible masse moléculaire. Ceci se traduit à la fois par la diminution de la teneur en macromolécules du vin et par un enrichissement en monomères de glucose libérés dans le vin. En pré-

Tableau 3

Macromolécules: concentration et composition en monnosaccharides
Macromolecule concentration and monosaccharide composition

Milieu synthétique	Polysaccharides neutres (mg Glucose·l ⁻¹)	Glucose Mannose (mg·10 mg ⁻¹ macromolécules)		Rapport (Mannose/Glucose)
		Glucose	Mannose	
+ lies	88 ± 8	4,08	5,47	1,3
+ lies + Vinoflow	244 ± 23	2,20	6,77	3,1

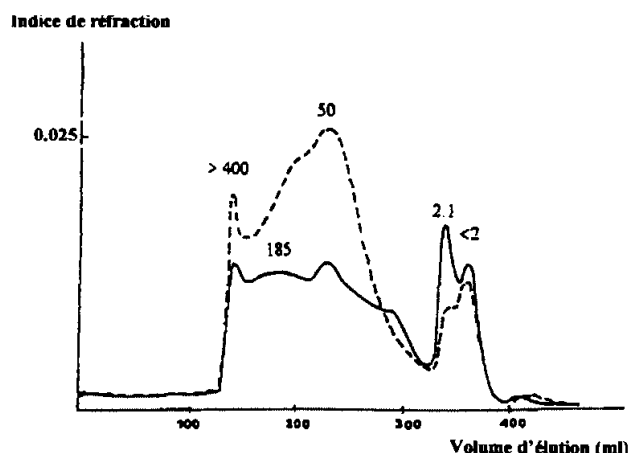


Fig. 3 : Chromatogrammes sur Sephacryl S 300 des macromolécules libérées dans le milieu synthétique à partir de lies avec (---) et sans (—) addition de la préparation enzymatique (masses moléculaires exprimées en kDa) (Essai 3).

Chromatograms (Sephacryl S 300) of macromolecules liberated in a synthetic medium from yeast lees with (---) or without (—) enzymatic preparation (molecular weight in kDa) (experiment 3).

sence de lies, cette préparation permet l'hydrolyse de deux fractions de haut poids moléculaire (>400 kDa et 270 kDa) et l'augmentation de macromolécules d'environ 46 kDa.

L'essai réalisé en milieu totalement synthétique permet de mieux définir l'action de cette glucanase sur les constituants pariétaux de la levure. Sans glucanase exogène, on observe surtout une libération dans le milieu, à partir des lies, de macromolécules de haut poids moléculaire (>400 kDa et 185 kDa). L'addition de la préparation enzymatique au milieu semble accélérer le phénomène. Une augmentation très significative de la teneur en glycoprotéines libérés dans le milieu synthétique est observée. Il s'agit vraisemblablement de mannoprotéines (augmentation du rapport mannose/glucose) d'environ 50 kDa. De plus, cette préparation semble capable d'hydrolyser les glucanes en monomères.

L'addition d'enzymes exogènes à forte activité β (1 \rightarrow 3) glucanasique dans le vin lors de l'élevage sur lies présente donc un intérêt certain. En accélérant la désorganisation du réseau pariétal, on permet ainsi une libération plus rapide de mannoprotéines dans le vin, constituants intéressants en œnologie vis à vis des stabilités tartrique et protéique.

Remerciements

Nous remercions la Cave coopérative des Hautes-Côtes de Beaune et D. NOFRONI, étudiant du Diplôme National d'Oenologue pour l'essai 1.

Références

- BLAKENEY, A. B.; HARRIS, P. J.; HENRY, R. J.; STONE, B. A.; 1983: A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharides analysis. *Carbohydr. Res.* **113**, 291-299.
- BOVIN, S.; FEUILLAT, M.; ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C.; 1998: Effect of must turbidity on cell wall porosity and macromolecule excretion of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on grape juice. *Amer. J. Enol. Viticult.* **49**, 325-332.
- CHARPENTIER, C.; N'GUYEN VAN LONG, T.; BONALY, R.; FEUILLAT, M.; 1986: Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 405-413.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F.; 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
- FERRARI, G.; FEUILLAT, M.; 1988: L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. I. Etude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. *Vitis* **27**, 183-197.
- FEUILLAT, M.; FREYSSINET, M.; CHARPENTIER, C.; 1989: L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. II. Evolution des macromolécules: polysaccharides et protéines. *Vitis* **28**, 161-176.
- FREYSSINET, M.; 1988: Etude des mécanismes de libération des constituants intracellulaires et pariétaux au cours du processus d'autolyse chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse Univ. Bourgogne.
- GUILLOUX-BENATIER, M.; GUERREAU, J.; FEUILLAT, M.; 1995: Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *Amer. J. Enol. Viticult.* **46**, 486-492.
- -; LE FUR, Y.; FEUILLAT, M.; 1998: Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *S. cerevisiae* and *O. oeni*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 144-149.
- LUBBERS, S.; FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C.; 1994: Influence of mannoproteins from yeast on the aroma intensity of a model wine. *Lebensm. Wiss. Technol.* **27**, 108-114.
- -; LEGER, B.; CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M.; 1993: Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle. *J. Intern. Sci. Vigne Vin* **27**, 13-22.
- MOINE-LEDoux, V.; PERRIN, A.; PALADIN, I.; DUBOURDIEU, D.; 1997: Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de mannoprotéines purifiées (Mannostab™). *J. Intern. Sci. Vigne Vin* **31**, 23-31.
- SCHREUDER, M. P.; MOOREN, A. T. A.; TOSCHKA, H. Y.; VERRIPS, C. T.; KLIS, F. M.; 1996: Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* **14**, 115-120.
- USSEGlio-TOMASSET, L.; 1976: Les colloïdes glucidiques des moûts et des vins. *Conn. Vigne Vin* **10**, 193-226.
- WATERS, E. J.; WALLACE, W.; TATE, M. E.; WILLIAMS, P. J.; 1993: Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *J. Agricult. Food Chem.* **41**, 724-730.

Reçu le 29 Mars 1999