

L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne II. Evolution des macromolécules: polysaccharides et protéines

par

M. FEULLAT, M. FREYSSINET et C. CHARPENTIER¹)

Der Ausbau von Weißweinen der Region Burgund auf dem Hefetrub II. Die Veränderungen der Makromoleküle: Polysaccharide und Proteine

Zusammenfassung: Weißweine der Region Burgund, die auf dem Hefetrub ruhen, reichern sich in einer ersten Phase mit Ethanol-fällbaren Makromolekülen an; in einer zweiten Phase verringert sich der Gehalt dieser Verbindungen nach Hydrolyse der aus der Hefezellwand stammenden Polysaccharide.

Untersuchungen in einem Modellmedium lassen erkennen, daß die wichtigsten Hydrolyseprodukte aus den Hefezellwänden Mannoproteine sind, die nach enzymatischer Hydrolyse der Glucane freigesetzt werden. Die für diese Hydrolyse verantwortlichen $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucanasen werden in das Autolysemedium abgegeben; gleiches gilt für eine Protease vom Typ A. Auch die Hydrolyse der Makromoleküle erfolgt im extrazellulären Medium.

Key words: must, wine, synthetic medium, lees, yeast, fermentation, autolysis, cell wall, colloid, protein, nitrogen, carbohydrate, sugar, enzyme, glucanase, protease.

Introduction

Dans un travail précédent (FERRARI et FEULLAT 1988), nous avons montré que les vins blancs élevés sur lies s'enrichissent en azote total, en acides aminés et en acides gras. Ces phénomènes qui relèvent de l'autolyse des levures et qui influencent les caractères sensoriels des vins ne sont pas les seuls qui caractérisent ce type de vinification.

Ainsi, LLAUBÈRE (1988) a montré qu'un vin conservé sur levures s'enrichit en macromolécules, notamment en polysaccharides d'origine pariétale. Nous avons fait des observations semblables dans les vins mousseux élaborés selon la méthode champenoise (FEULLAT *et al.* 1988). Ces phénomènes sont sans aucun doute en rapport avec la modification de la composition chimique de la paroi de levure au cours de l'autolyse mise en évidence par CHARPENTIER *et al.* (1986).

Dans cette étude nous avons établi les cinétiques de production et la nature des macromolécules libérées par les levures en milieu synthétique, dans les moûts et dans les vins, d'une part au cours de la fermentation alcoolique, d'autre part au cours de l'autolyse des cellules, notamment dans les cas de l'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. Nous avons cherché à préciser en milieu modèle (FREYSSINET 1988) les mécanismes enzymatiques mis en jeu au niveau de la libération et de la transformation des macromolécules exocellulaires produites au cours de l'autolyse des levures.

¹) Avec la collaboration technique de J. GUERREAU.

Matériel et méthodes

1. Milieux de fermentation

1.1 Milieu synthétique

Le milieu utilisé est le milieu de Wickerham Yeast Nitrogen Base enrichi à 185 g/l de saccharose, ajusté à pH 3,4 avec de l'acide tartrique,ensemencé avec l'une ou l'autre souche de levure de vinification testée au taux de 10^6 cellules/ml et mis en fermentation à une température régulée de 28 °C.

1.2 Moûts de raisin

Les moûts utilisés sont des moûts blancs issus du cépage Chardonnay récolté en Bourgogne dans l'aire d'appellation d'origine contrôlée «Meursault». Ces moûts sont pour certaines expérimentations clarifiés selon différentes techniques: débouillage à l'anhydride sulfureux, à la bentonite, addition de pectinases, filtration sur membrane . . . , avant la fermentation alcoolique qui se déroule soit dans des petites cuves en acier inoxydable de 1 hl, soit dans des fûts de chêne de 228 l.

Pour l'étude de la conservation sur levures, les vins ayant fermenté en fûts de chêne sont séparés en trois lots:

- lot 1: vin soutiré en fin de fermentation alcoolique et conservé en fûts sur lies fines
- lot 2: vin conservé en fût sur lies totales de fermentation alcoolique
- lot 3: vin conservé en fût sur lies totales remises en suspension toutes les semaines par »bâtonnage» pendant la durée de vieillissement.

Chaque lot est conservé pendant 8 mois à la température de 15 °C.

2. Souches de levures

Les levures sèches suivantes du commerce ont été utilisées: *S. cerevisiae* Lalvin (Setric Biologie), Levuline ALS (CEnofrance), *S. bayanus* Levuline CHP (CEnofrance), I.O.C. (Institut CEnologique de Champagne), Uvaferm BC (Novo Ferment).

Les milieux sontensemencés aux doses de 150 mg/l de biomasse sèche.

3. Milieu et conduite de l'autolyse

Ce milieu qui a une composition proche du vin avec un titre alcoométrique de 10 % et un pH de 3 est décrit par FREYSSINET (1988).

Les levures sèches après réhydratation, lavages répétés et centrifugation sont mises en suspension dans le milieu hydroalcoolique à la dose de 150 g de poids humide dans 950 ml de milieu. L'autolyse est conduite à 40 °C soit pendant 14 d avec des prélèvements intermédiaires quotidiens jusqu'au 9ème d, soit pendant 48 h avec des prélèvements intermédiaires à 0, 6, 12 et 24 h.

Chaque prélèvement est centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à + 4 °C. La biomasse et le surnageant, ainsi séparés, sont répartis en différents lots en vue des analyses ultérieures.

4. Techniques analytiques

4.1 Dosage de l'azote total

L'azote total des milieux synthétiques, des moûts et des vins est dosé selon la méthode de Kjeldahl mise en œuvre sur un appareillage Kjelttec System (Tecator).

4.2 Dosage des colloïdes totaux

Les colloïdes solubles totaux sont dosés dans les milieux synthétiques, les moûts et les vins préalablement centrifugés par précipitation à l'éthanol selon le mode opéra-

toire décrit par FREYSSINET (1988) avec en particulier le séchage des précipités par lyophilisation.

4.3 Dosage de l'azote protéique

Il est dosé dans les milieux et dans les colloïdes (solution à 1 ‰) selon la méthode de BRADFORD (1976) au bleu de Coomassie Brillant G-250 et étalonnage par une solution de «Serum Albumine Bovine (BSA)» Sigma.

4.4 Dosage de l'azote aminé libre

Les fonctions amines libres des acides aminés ou des peptides sont dosées par colorimétrie à l'aide du réactif de Sanger au dinitro fluoro benzene (DNFB).

4.5 Dosage des oses totaux

Ils sont déterminés dans les milieux et dans les colloïdes (solution à 1 ‰) par la méthode au phénol sulfurique du DUBOIS *et al.* (1956) avec étalonnage par une solution de glucose.

4.6 Identification et dosage des oses par chromatographie gazeuse

Après hydrolyse des colloïdes en milieu HCl 2N en ampoule scellée à 105 °C pendant 30 min, les oses constitutifs sont dosés selon la méthode de SAWARDEKER *et al.* (1965) légèrement modifié selon FREYSSINET (1988) avec chromatographie des acétates d'alditol sur une colonne en verre remplie SP 2340 à 3 % sur 100/120 supelcoport sous une pression d'azote de 2 at, et des pressions d'hydrogène et d'air respectivement de 0,9 et 0,6 at. La température est programmée de 160 °C à 265 °C à raison de 2 °C/min.

Les oses sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des oses d'une solution standard et la quantification se fait par rapport à une étalon interne qui est le meso-inositol.

4.7 Fractionnement des macromolécules glucidiques et protéiques par tamisage moléculaire sur gel

Les colloïdes totaux précipités à l'éthanol et séchés à partir des milieux synthétiques, des moûts ou des vins sont mis en solution à 6 ‰ dans l'éluant utilisé.

4.7.1 Fractionnement des polysaccharides

Ce fractionnement s'effectue par chromatographie sur colonne de Sepharose CL6B. Le domaine de fractionnement de ce gel se situe entre 10³ kDa et 10 kDa pour les polysaccharides.

Le dispositif utilisé présente les caractéristiques suivantes:

- Colonne Pharmacia K 26/100; volume total du gel: VT = 405 ml; volume d'exclusion du gel: V₀ = 165ml
- Eluant: Solution de Na₂SO₄ 0,05 M; débit = 30 ml/h
- Volume injecté = 5 ml
- Collection par fractions de 3 ml
- Détection en sortie de colonne par la méthode de DUBOIS *et al.* (1956) et colorimétrie à 490 nm

L'étalonnage de la colonne est réalisé à l'aide de dextrans standards selon la technique de GRANATH et KVIST (1967) adaptée par PARENTHOEN et FEUILLAT (1978).

4.7.2 Fractionnement des protéines

Ce fractionnement s'effectue par chromatographie sur colonne de Sephacryl S-300. Ce gel a un domaine de fractionnement de 1,5 × 10³ kDa à 10 kDa pour les protéines,

c'est à dire comparable à celui du Sepharose CL6B pour les polysaccharides.

Le dispositif utilisé présente les caractéristiques suivantes:

- Colonne Pharmacia K 26/70; volume total du gel: VT = 360 ml; volume d'exclusion du gel: V₀ = 134 ml
 - Eluant: tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7; débit = 50 ml/l
 - Collection par fractions de 2 ml
 - Détection en sortie de colonne par la mesure de la DO à 280 nm
- La colonne est étalonnée par un mélange de protéines standards (FREYSSINET 1988).

4.8 Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions

La technique est décrite par FREYSSINET (1988). Le gel utilisé est le DEAE-Sephadex A-25 avec élution par palier en changeant brusquement la force ionique par passages successifs d'eau distillée, de carbonate d'ammonium 0,1 M — 0,5 M — 1,0 M, pH 8. La détection en sortie de colonne se fait par mesure de la DO 280 nm pour les protéines et de la DO 490 nm pour les polysaccharides (méthode de DUBOIS *et al.* 1956).

4.9 Mesures des activités enzymatiques

4.9.1 Dosage de l'activité de type protéase A

Les extraits cellulaires sont préparés selon le protocole décrit par BÉAVAN *et al.* (1979) et repris par FREYSSINET (1988).

Le dosage de l'activité dans les extraits cellulaires et dans le milieu extracellulaire est effectué en mesurant la libération de l'azote aminé à partir d'hémoglobine dénaturée à l'acide selon le mode opératoire décrit par LEROY (1986) et repris par FREYSSINET (1988).

L'activité protéasique est exprimée en µg d'azote libéré par g de matière sèche (MS) et par min.

4.9.2 Dosage de l'activité β(1→3)-glucanase

La technique utilisée est celle décrite par HIEN et FLEET (1983 a) en suivant la libération d'oses réducteurs à partir de la laminarine à la fois dans les cellules de levures préalablement lavées et dans le milieu extracellulaire.

L'activité de la β(1→3)-glucanase est exprimée en µg de glucose libéré par g de matière sèche (MS) et par min.

Résultats

1. Production de colloïdes exocellulaires par les levures (*Saccharomyces*) en milieu synthétique: quantité et nature des macromolécules libérées au cours de la fermentation alcoolique et de l'autolyse

Le Tableau 1 montre que la teneur en colloïdes totaux du milieu de Wickerham Yeast Nitrogen Base enrichi à 185 g/l de sucre ensemencé avec la souche de *Saccharomyces bayanus* Levuline CHP augmente tout au long de la fermentation alcoolique pour atteindre en peu moins de 300 mg/l après 6 d.

Si l'on fait suivre la fermentation alcoolique d'une autolyse par chauffage du milieu à 50 °C pendant 48 h en présence des levures, il se produit un très fort enrichissement du milieu en colloïdes totaux puisque la teneur en ceux-ci passe de 270 mg/l à 2 230 mg/l. Cette forte libération de macromolécules exocellulaires par les levures est due à une autolyse accélérée des cellules par la chaleur.

Tableau 1

Evolution des colloïdes totaux et de leur composition au cours de la fermentation alcoolique (F.A.) et après une autolyse des levures de 48 h à 50 °C

Die Entwicklung der Gesamtkolloide und ihrer Zusammensetzung im Verlauf der alkoholischen Gärung (F.A.) und nach Autolyse der Hefen (48 h bei 50 °C)

Temps de prélèvement	Colloïdes totaux (mg/l)	Composition des colloïdes	
		Glucides (%)	Protéines (%)
15 h	115	92	8
4 d	140	85	15
6 d (fin de la F. A.)	270	82	18
8 d (après autolyse)	2 230	82	8

Pour ce qui est de la composition des colloïdes libérés au cours de la fermentation alcoolique comme au cours de l'autolyse, on constate qu'ils sont constitués de 80 à 90 % environ de glucides et de 10 à 20 % de protéines.

La partie glucidique des macromolécules précipitées à l'alcool en fin de fermentation alcoolique renferme 70 à 80 % de mannose et 20 à 30 % de glucose, ceci quelle que soit la souche de levure testée.

Cette observation indique l'origine pariétale des macromolécules cédées par les levures, puisque de nombreux travaux dont certains récents (SENTANDREU *et al.* 1984) ont établi que la paroi levurienne est constituée de mannanes ou plus exactement de mannoprotéines associées à des glucanes.

Le tamisage moléculaire sur colonne de Sepharose CL6B des polysaccharides libérés par les levures au cours de la fermentation alcoolique permet de séparer plusieurs

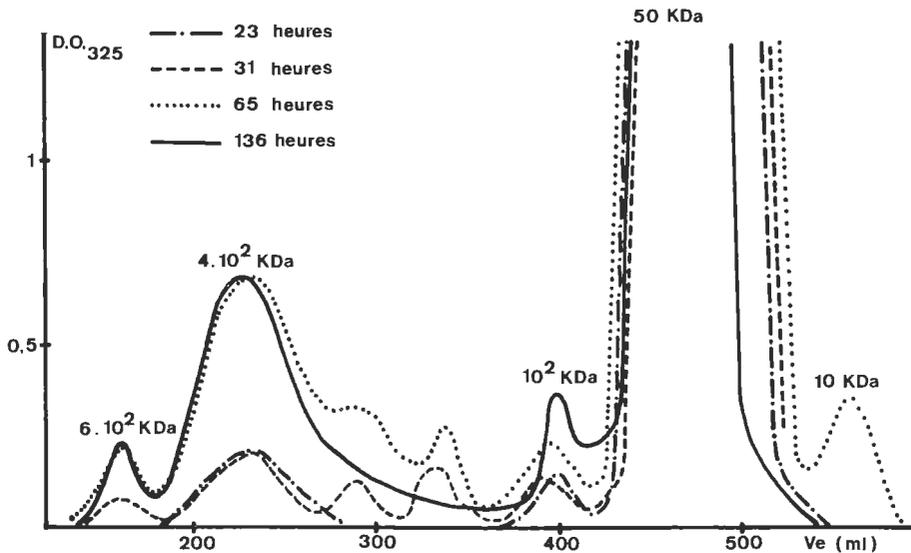


Fig. 1: Fractionnement sur une colonne de Sepharose CL6B des polysaccharides. Evolution au cours de la fermentation alcoolique.

Auftrennung der Polysaccharide auf einer Sepharose-CL6B-Säule. Die Veränderungen im Verlauf der alkoholischen Gärung.

fractions dont les masses moléculaires s'échelonnent entre $6 \cdot 10^2$ kDa et 10 kDa (Fig. 1). D'une façon générale ces différentes fractions augmentent tout au long de la fermentation alcoolique, notamment entre 23 et 65 h.

2. Production de colloïdes exocellulaires par les levures (*Saccharomyces*) dans les moûts de raisin et dans les vins

Comme en milieu synthétique, les levures enrichissent les moûts et les vins en macromolécules d'origine pariétale d'une part au cours de la fermentation alcoolique, d'autre part au cours de la conservation sur levures telle qu'elle est pratiquée dans le cas de l'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne, vins dans lesquels se produit une autolyse des cellules levuriennes (FERRARI et FEUILLAT 1988).

2.1 Production au cours de la fermentation alcoolique

2.1.1 Influence de la clarification préalable des moûts

La libération de macromolécules exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique est plus difficile à mettre en évidence dans un moût de raisin que dans un vin. En effet dans le moût cette libération est plus ou moins compensée par l'hydrolyse et la précipitation des colloïdes du raisin, et en particulier des polysaccharides acides ou pectines.

En réalité, la clarification préalable du moût ou «débouillage» a une forte incidence sur les variations de teneurs en colloïdes au cours de la fermentation alcoolique. Ainsi,

Tableau 2

Influence du mode de clarification des moûts sur l'évolution des colloïdes totaux au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de Chardonnay

Der Einfluß des Verfahrens der Mostklärung auf die Entwicklung der Gesamtkolloide im Verlauf der alkoholischen Gärung eines Chardonnay-Mostes

Nature du lot	Colloïdes totaux (mg/l)		C _{Vin} - C _{Moût} (mg/l)	$\frac{(C_{Vin} - C_{Moût}) \times 100}{C_{Moût}}$
	Moût	Vin		
1: Débouillage au SO ₂ (5 g/hl)	1 233	1 013	-220	-17,8
1': pendant 48 h	1 252	1 053	-204	-16,2
2: Débouillage au froid (+7 °C) pendant 48 h	1 153	1 380	+227	+19,7
3: Débouillage à la bentonite (100 g/hl)	1 160	1 433	+273	+23,5
3': pendant 48 h	1 173	1 407	+234	+19,2
4: Débouillage avec addition de pectinases (3 g/hl)	733	1 123	+390	+53,2
5: Moût filtré successivement sur des membranes de 10 µm et de 0,65 µm	810	1 133	+323	+39,9

C_{Moût}: Concentration dans le moût.

C_{Vin}: Concentration dans le vin.

Tableau 3

Composition en oses (%) des polysaccharides des moûts et des vins correspondants

Die in den Polysacchariden der Moste und der entsprechenden Weine enthaltenen Monosaccharide in %

	Rha	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu
Moût débourbé au SO ₂	9,5	1,8	33,0	1,3	6,1	36,2	12,1
Vin	7,2	1,4	30,2	0,5	20,6	30,5	9,3
Moût débourbé à la bentonite	9,0	1,7	37,2	1,7	6,2	32,8	11,4
Vin	7,2	1,1	25,9	0,8	25,8	29,2	9,7

comme le montre le Tableau 2, ce sont les moûts les plus fortement appauvris en colloïdes tels que ceux qui sont additionnés de pectinases ou encore ceux qui sont filtrés sur membrane qui s'enrichissent le plus au cours de la fermentation alcoolique.

Nous avons déjà fait des observations semblables dans le cadre d'essais de filtration tangentielle (FEUILLAT et BERNARD 1985). Un moût ultrafiltré fortement appauvri en polysaccharides peut donner après fermentation alcoolique un vin aussi riche que le vin issu du moût témoin de même origine clarifié grossièrement par décantation.

2.1.2 Composition des polysaccharides des moûts et des vins

Si l'on compare la composition en oses du moût et du vin correspondant (Tableau 3), on observe que les polysaccharides du moût sont essentiellement constitués de galactose et d'arabinose, alors que les polysaccharides du vin sont plus riches en mannose.

Après fractionnement des polysaccharides d'un vin en fonction de leur masse moléculaire sur colonne de Sepharose CL6B, il apparaît que les fractions de forte masse moléculaire sont beaucoup plus riches en mannose que les fractions de plus faible masse moléculaire (Tableau 4).

Ainsi, comme en milieu synthétique, il y a au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin libération par les levures de polysaccharides d'origine pariétale, notamment de manannes de masse moléculaire élevée.

Tableau 4

Composition en oses (%) des différentes fractions de polysaccharides séparés sur Sepharose CL6B à partir d'un vin de «Meursault»

Die in den einzelnen Polysaccharidfraktionen eines Meursault-Weines enthaltenen Monosaccharide in % · Die Auftrennung erfolgte auf Sepharose CL6B

Oses	Fraction 1 (M = 1,8 × 10 ³ kDa)	Fraction 2 (M = 150 kDa)	Fraction 3 (M = 25 kDa)
Rhamnose	1,0	2,0	10,9
Ribose	—	—	13,3
Arabinose	7,3	8,3	13,5
Mannose	88,8	59,1	29,4
Galactose	—	21,6	20,0
Glucose	2,7	8,9	12,6

2.2 Production de colloïdes exocellulaires au cours de la conservation des vins sur levures

Dans les essais d'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne d'appellation «Meursault», nous constatons qu'après 8 mois d'élevage ce sont les lots conservés sur lies totales remises en suspension régulièrement ou «batonnées» qui sont les plus riches en colloïdes totaux et en azote total (Tableau 5). Ces résultats sont en accord avec ceux de LLAUBÈRES (1988) qui dans des essais semblables conduits sur des vins blancs de Bordeaux met en évidence une production de polysaccharides par les levures pendant et après la fermentation alcoolique. Ce même auteur observe également une incidence positive sur la production de macromolécules de l'agitation régulière de la biomasse dans le vin.

Tableau 5

Influence des lies sur la composition de vins blancs de «Meursault» après 8 mois d'élevage en fûts
Der Einfluß des Hefetrubs auf die Zusammensetzung weißer Meursault-Weine nach 8monatigem Faßausbau

	Colloïdes totaux (mg/l)	Azote total (mg/l)
Vins conservés sur lies fines	809	350
Vins conservés sur lies totales	896	368
Vins conservés sur lies totales «batonnées»	930	392

Tableau 6

Cinétiques d'évolution des colloïdes totaux et de l'azote total au cours de la vinification en blanc et de l'élevage sur lies d'une vendange de Chardonnay millésime 1987

Die Veränderungen der Gesamtkolloide und des Gesamtstickstoffes im Verlauf der Weißweinbereitung und des Weinausbaues auf der Hefe bei einem Chardonnay-Wein, Jahrgang 1987

	Colloïdes totaux (mg/l)	Azote total (mg/l)
Moût brut	1 575	413
Moût débourbé au SO ₂ (8 g/hl) pendant 24 h	1 092	371
Moût débourbé au Lacta B ¹⁾ (200 g/hl) pendant 36 h	780	378
Vin débourbé au SO ₂ en fin de fermentation alcoolique	1 064	210
Vin débourbé au Lacta B en fin de fermentation alcoolique	888	140
Vin débourbé au SO ₂ laissé sur lies totales pendant 3 mois	1 368	231
Vin débourbé au Lacta B laissé sur lies totales pendant 3 mois	983	224
Vin débourbé au SO ₂ laissé sur lies totales pendant 8 mois	730	277
Vin débourbé au Lacta B laissé sur lies totales pendant 8 mois	650	262

¹⁾ Mélange de bentonite et de caséine.

Toutefois, en suivant régulièrement l'évolution des colloïdes dans des vins conservés sur lies totales, on observe après un enrichissement pendant les premiers mois d'élevage une diminution dans les mois qui suivent, alors que la teneur en azote total des mêmes vins continue, elle, d'augmenter régulièrement (Tableau 6), ce qui prouve le déroulement continu de l'autolyse. CASTINO et DELFINI (1986) observent également cette diminution et émettent comme hypothèses des phénomènes de précipitation, d'adsorption par les levures ou d'hydrolyse.

En ce qui concerne nos essais, la chromatographie sur Sepharose CL6B des vins conservés sur levures met en évidence une disparition des fractions glucidiques de plus fortes masses moléculaires entre 3 et 8 mois d'élevage sur lies (Fig. 2).

Ayant déjà fait la même observation dans l'étude du vieillissement des vins mousseux élaborés selon la méthode champenoise (FEUILLAT *et al.* 1988), nous avons cherché parallèlement à ces essais à préciser en milieu synthétique les mécanismes enzymatiques de libération et de transformation des macromolécules exocellulaires libérées par les levures au cours de leur autolyse (FREYSSINET 1988).

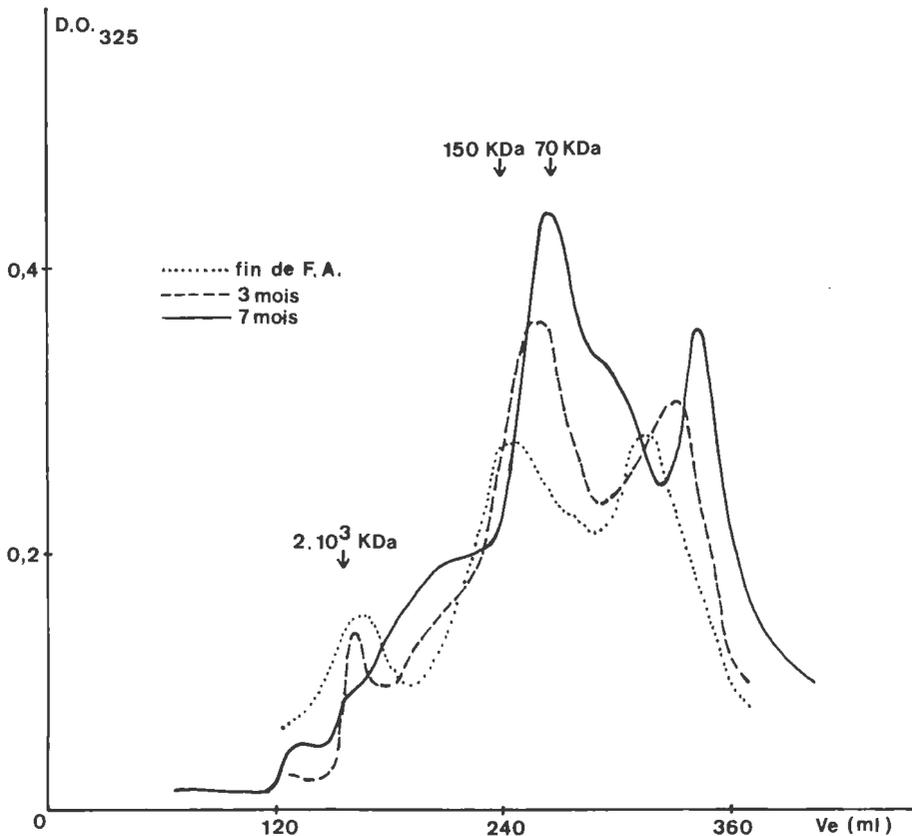


Fig. 2: Evolution des polysaccharides (séparés sur Sepharose CL6B) d'un vin de «Meursault» (millésime 1987) au cours de sa conservation sur levures.

Die Entwicklung der Polysaccharide (Auftrennung auf Sepharose CL6B) eines Meursault-Weines, Jahrgang 1987, im Verlauf seiner Lagerung auf dem Hefetrib.

3. Mécanismes enzymatiques de la libération et de la transformation des macromolécules exocellulaires produites au cours de l'autolyse des levures

L'étude de l'évolution de la composition en oses du milieu d'autolyse conduite à pH 3 et à 40 °C (Tableau 7) met en évidence un enrichissement beaucoup plus important en glucose qu'en mannose bien que ce dernier sucre soit en augmentation continue et qu'il soit comme nous l'avons vu précédemment le constituant majeur des polysaccharides produits par les levures.

Tableau 7

Evolution des sucres dans le milieu d'autolyse
Die Entwicklung der Zucker im Autolysemedium

	Temps (d)						
	0	1	2	3	6	9	14
Ribose %	2,8	4,0	3,6	3,3	3,1	3,6	3,0
Mannose %	2,4	5,3	7,0	8,0	8,0	16,4	20,2
Glucose %	94,8	90,7	89,4	88,7	86,6	80,0	76,8

Cette observation laisse prévoir que les manannes constitutifs de la paroi sont libérés sans hydrolyse, alors que les glucanes sont hydrolysés sous la forme de courtes chaînes ou de monomères. D'ailleurs une activité $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanase peut être mise en évidence au cours de l'autolyse des levures à la fois dans les cellules et dans le milieu (Fig. 3).

Du ribose est libéré en faible quantité dans le milieu d'autolyse et résulte de la dégradation des composés ribonucléiques intracellulaires.

Concernant la libération des autres composés azotés contenus dans la cellule au cours de l'autolyse, le milieu s'enrichit en azote total et en azote aminé libre. Pour ce

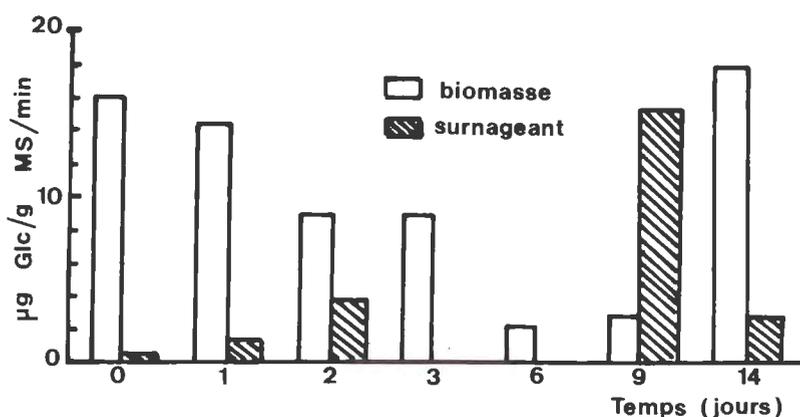


Fig. 3: Evolution de l'activité de la $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanase pendant l'autolyse dans les cellules de levures (biomasse) et dans le milieu d'autolyse (surnageant).

Die Entwicklung der $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucanase-Aktivität während der Autolyse in den Hefezellen (biomasse) und im Autolysemedium (surnageant).

qui est des protéines, il y a d'abord un enrichissement du milieu, puis le taux de ces constituants diminue après 48 h d'autolyse environ (Fig. 4). Cette diminution est liée à une activité protéasique de type A que l'on peut doser à la fois dans les cellules et dans le milieu d'autolyse (Fig. 5).

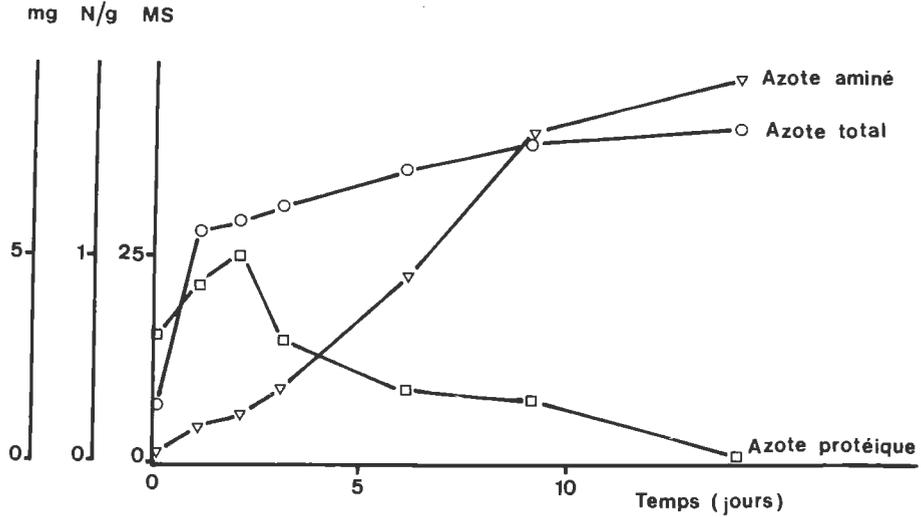


Fig. 4: Evolution des différents composés azotés cédés par les levures durant l'autolyse.

Die Entwicklung der verschiedenen Stickstoffverbindungen, die von den Hefen im Verlauf der Autolyse abgegeben werden.

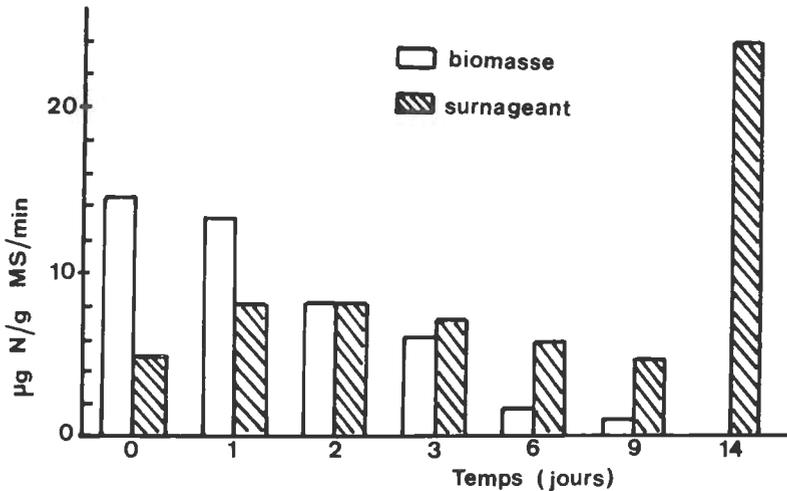


Fig. 5: Evolution de l'activité protéasique pendant l'autolyse dans les cellules de levures (biomasse) et dans le milieu d'autolyse (surnageant).

Die Entwicklung der Proteasenaktivität während der Autolyse in den Hefezellen (biomasse) und im Autolysemedium (surnageant).

La protéolyse extracellulaire est confirmée par tamisage moléculaire du milieu d'autolyse sur colonne de Sephacryl S300. En effet, les protéines séparées qui ont une masse moléculaire de l'ordre de 12,8 kDa après 6 h d'autolyse sont hydrolysées en des fractions d'une masse moléculaire inférieure à 10 kDa après 48 h d'autolyse (Fig. 6).

La chromatographie du milieu d'autolyse par échange d'ions sur DEAE Sephadex G25 après 48 h d'incubation (Fig. 7) met en évidence une fraction non chargée renfermant à la fois des peptides et des polysaccharides, ces derniers étant constitués de 93 % de mannose et de 7 % de glucose.

Cette fraction peut être assimilée à un peptidomannane ou à une mannoprotéine, ce dernier terme ayant été proposé par BALLOU (1982) (cité par LLAUBÈRES 1988) pour les mannanes de la paroi de levure.

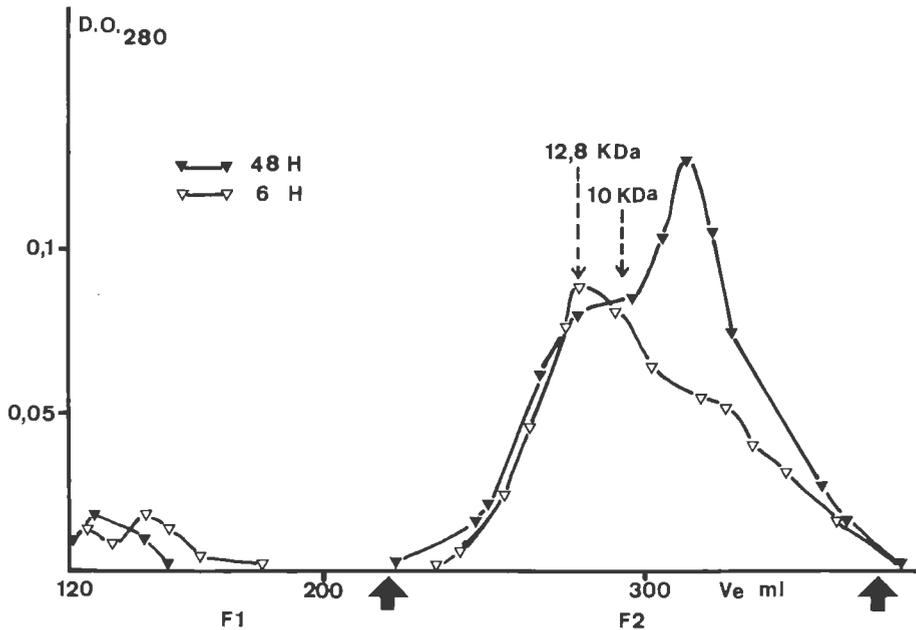


Fig. 6: Fractionnement par tamisage moléculaire sur colonne de Sephacryl S300 des protéines libérées dans le milieu après 6 et 48 h d'autolyse.

Auftrennung der im Autolysemedium enthaltenen freien Proteine nach dem Molekulargewicht (Sephacryl-S300-Säule) nach 6- und 48stündiger Autolyse.

Discussion

Les levures de vinification cultivées en milieu acide libèrent des colloïdes précipitables à l'éthanol tout au long de la fermentation alcoolique, parallèlement à leur croissance. La mise en autolyse de ces mêmes levures en fin de fermentation alcoolique augmente fortement l'enrichissement du milieu extracellulaire en macromolécules.

Celles-ci sont essentiellement des polysaccharides et notamment des manannes associées à des protéines, ce qui indique leur origine pariétale à la fois quand elles sont produites par des cellules vivantes au cours de la fermentation alcoolique et par des cellules mortes au cours de l'autolyse.

Dans le premier cas le relargage de polysaccharides et de protéines serait associé à la synthèse de la paroi levurienne, comme l'ont suggéré LLAUBÈRES *et al.* (1987). Dans le second cas, ce même relargage correspondrait à l'altération de la structure et de la composition chimique de la paroi levurienne mise en évidence au cours de l'autolyse (CHARPENTIER *et al.* 1986).

Un enrichissement semblable en colloïdes par les levures est observé dans les moûts de raisin au cours de leur fermentation alcoolique et dans les vins au cours de leur conservation sur levures. Le degré de clarification des moûts qui conditionne leur fermentescibilité a une incidence très significative sur les quantités de macromolécules produites par les levures au cours de la fermentation alcoolique.

Un moût fortement clarifié, donc appauvri en colloïdes du raisin, a en effet une moins bonne fermentescibilité (OLLIVIER *et al.* 1987), et l'on peut supposer que la production de polysaccharides par les levures sera alors plus importante à cause d'un taux de mortalité plus élevé et d'une autolyse plus rapide des cellules.

Au cours de la conservation des vins sur levures, après un enrichissement en colloïdes, on observe une diminution de ceux-ci qui est due à une hydrolyse des polysaccharides en fractions de masse moléculaire plus faible pouvant échapper à la précipitation à l'éthanol.

Cette hydrolyse des polysaccharides est liée à une activité $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanase mise en évidence au cours de l'autolyse des levures dans un milieu synthétique qui s'enrichit beaucoup plus en glucose qu'en mannose, bien que ce dernier sucre soit le constituant principal des polysaccharides pariétaux libérés. Ainsi les manannes constitutifs de la

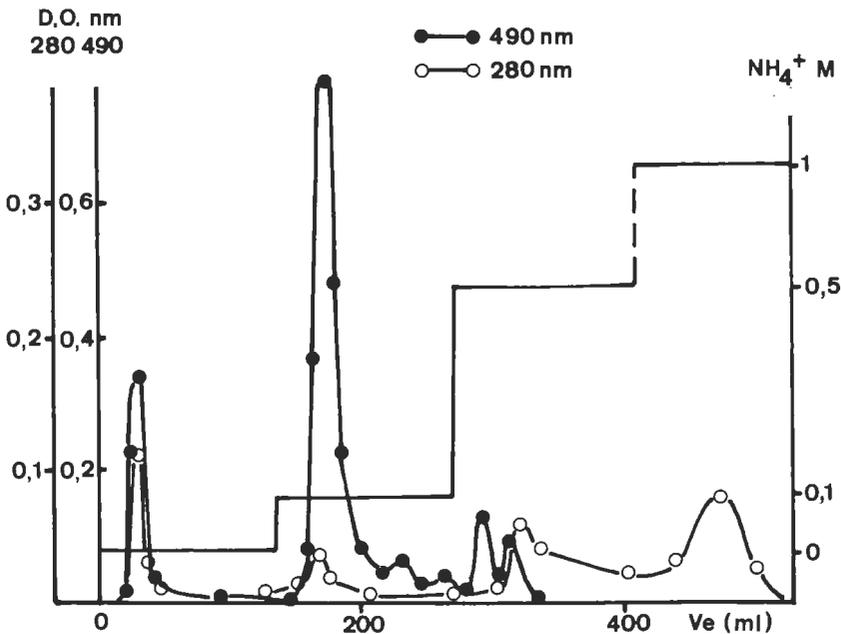


Fig. 7: Séparation par chromatographie échangeuse d'ions des colloïdes libérés après 48 h d'autolyse. — D.O.₄₉₀: Polysaccharides, D.O.₂₈₀: Protéines.

Auftrennung der freien Kolloide (Ionenaustauschchromatographie) nach 48stündiger Autolyse. — D.O.₄₉₀: Polysaccharide, D.O.₂₈₀: Proteine.

paroi seraient libérés sans hydrolyse, alors que les glucanes seraient hydrolysés sous la forme d'oligomères ou de monomères.

Ces observations et ces hypothèses sont en accord avec les travaux de HIEN et FLEET (1983 a et b) qui ont séparé et caractérisé six $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanases chez *S. cerevisiae* et qui ont montré que ces enzymes fortement liées à la paroi peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire.

Ainsi les β -glucanases jouent un rôle important dans l'autolyse des parois, contrairement aux manannases qui n'auraient qu'une action limitée. FLEET (1984) observe en effet qu'au cours de l'autolyse de *S. cerevisiae*, le mannane est le principal produit soluble, malgré la mise en évidence d'une mannosidase chez la même levure.

Parallèlement à l'hydrolyse enzymatique des glucanes, on observe une protéolyse dans le milieu d'autolyse liée à une activité protéasique de type A libérée par les cellules de levures. Cette activité déjà mise en évidence au cours de l'autolyse des levures par CHARPENTIER *et al.* (1986) a également été caractérisée en champagnisation (LEROY 1986) et dans les vins blancs élevés sur lies (FERRARI et FEULLAT 1988).

Les polypeptides libérés dans le milieu extracellulaire sont associés à des polysaccharides constitués pour 93 % de mannose.

Le principal produit de l'autolyse est donc en fin de compte un peptidomannane ou mannoprotéine caractérisée également par LLAUBÈRES (1988) par précipitation par le cetavlon sous la forme d'un complexe boraté.

Ces mannoprotéines liées de façon covalente aux glucanes de la paroi (SENTANDREU *et al.* 1984) seraient libérées dans le milieu extracellulaire après l'action hydrolytique des $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanases, puis seraient remaniées dans ce même milieu par une hydrolyse partielle de la fraction protéique sous l'action d'une protéase acide de type A cédée par les cellules levuriennes au cours de l'autolyse. L'hydrolyse des glucanes libérés se poursuit dans le milieu extracellulaire dans lequel les β -glucanases sont solubilisées.

Conclusion

Le relargage de macromolécules d'origine pariétale par les levures de vinification en milieu acide au cours de la fermentation alcoolique et de l'autolyse est confirmé.

Dans les moûts une clarification préalable poussée qui diminue leur fermentescibilité accroît la quantité de macromolécules produite par les levures.

Dans la conservation sur lies, après un enrichissement du vin pendant les premiers mois en colloïdes précipitables à l'éthanol, la teneur de ceux-ci diminue à la suite d'une hydrolyse des polysaccharides de plus haute masse moléculaire. Ce phénomène peut expliquer la plus grande facilité de clarification de ces vins qui est toujours observée après 7 à 8 mois de conservation sur levures. La même observation est d'ailleurs faite pour la clarification ou « remuage » des vins mousseux élaborés selon la méthode champenoise.

Les principaux produits de l'autolyse provenant des parois sont des mannoprotéines qui sont libérées dans le milieu extracellulaire après une hydrolyse enzymatique des glucanes. Les $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanases responsables de cette hydrolyse sont libérées dans le milieu d'autolyse et il en est de même d'une protéase de type A. Ainsi l'hydrolyse des macromolécules se poursuit dans le milieu extracellulaire.

Un remaniement semblable des macromolécules peut être supposé dans les vins élevés sur lies tels que les grands vins blancs de Bourgogne. Outre son rôle sur la clarification, ce phénomène a vraisemblablement une incidence sur les caractères sensoriels des vins, compte tenu des interactions qui peuvent exister entre les macromolécules et les composés volatils (VOILLEY *et al.*, à paraître).

Résumé

La conservation sur lies des vins blancs de Bourgogne se traduit dans un premier temps par un enrichissement de ceux-ci en composés macromoléculaires précipitables à l'éthanol; puis dans un second temps la teneur en ces composés diminue à la suite d'une hydrolyse des polysaccharides d'origine pariétale.

Un étude en milieu modèle permet de préciser que les principaux produits de l'autolyse provenant des parois de levures sont des mannoprotéines qui sont libérées après une hydrolyse enzymatique des glucanes. Les $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanases responsables de cette hydrolyse sont libérées dans le milieu d'autolyse et il en est de même d'une protéase de type A. Ainsi l'hydrolyse des macromolécules se poursuit dans le milieu extracellulaire.

Remerciements

Nous remercions la Fédération et le Comité Interprofessionnel des Vins de Bourgogne pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de cette étude.

Bibliographie

- BEAVAN, M. I.; BELKE, D. M.; STEWART, G. G.; ROSE, A. H.; 1979: Changes in electrophoretic mobility and lytic enzyme activity associated with development and flocculating ability in *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. **25**, 888—895.
- BRADFORD, M. M.; 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Ann. Biochem. **72**, 248—254.
- CASTINO, M.; DELFINI, C.; 1986: Studio sui fattori che determinato la cessione di colliidi glucidi da parte dei lieviti. Vignevini **13** (1—2), 33—40.
- CHARPENTIER, C.; NGUYEN 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. J.; REVERS, P. A.; SMITH, F.; 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Ann. 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.; BERNARD, P.; 1985: Influence de la filtration tangentielle des moûts et des vins sur leur composition en colloïdes. Ultrafiltration et microfiltration tangentielles en œnologie. Institut Technique de la Vigne et du Vin, 23 et 24 janvier 1985, Paris.
- — ; CHARPENTIER, C.; PICCA, G.; BERNARD, P.; 1988: Production de colloïdes par les levures dans les vins mousseux élaborés selon la méthode champenoise. Rev. Franc.Œnol., Cahiers Scientifiques **111**, 36—45.
- FLEET, G. H.; 1984: The occurrence and function of endogenous wall degrading enzymes in yeasts. FEMS Symposium n°4, Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis, 227—238.
- FREYSSINET, M.; 1988: Etude des Mécanismes de Libération des Constituants Intracellulaires et Pariétaux au Cours du Processus d'Autolyse chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat, Univ. de Bourgogne, Dijon.
- GRANATH, K. A.; KVIST, B. E.; 1967: Determination of molecular weight distributions. J. Chromatogr. **28**, 69—81.
- HIEU, N. G. H.; FLEET, G. H.; 1983 a: Separation and characterization of six (1→3)- β -glucanases from *S. cerevisiae*. J. Bacteriol. **156**, 1204—1213.
- — ; — — ; 1983 b: Variation of (1→3)-R-glucanases in *S. cerevisiae* during vegetative growth, conjugation and sporulation. J. Bacteriol. **156**, 1214—1220.
- LEROY, M. J.; 1986: Incidence de la Nature des Souches de Levures et des Conditions de Préparation des Levains sur les Phénomènes d'Autolyse dans le Vin de Champagne. Thèse de Docteur-Ingénieur, Univ. de Bourgogne, Dijon.

- LLAUBÈRES, R. M.; 1988: Les Polysaccharides sécrétés dans les Vins par *Saccharomyces cerevisiae* et *Pediococcus*. Thèse de Doctorat, Univ. de Bordeaux II.
- — ; DUBOURDIEU, D.; VILLETAZ, J. C.; 1987: Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food Agricult.* **41**, 277—286.
- OLLIVIER, C.; STONESTREET, T.; LARUE, FRANÇOISE; DUBOURDIEU, D.; 1987: Incidence de la composition colloïdale des moûts blancs sur leur fermentescibilité. *Connaiss. Vigne Vin* **21**, 59—70.
- PARENTHOEN, A.; FEULLAT, M.; 1978: Les colloïdes solubles du vin de Champagne. Relation avec le «remuage». *Connaiss. Vigne Vin* **12**, 177—193.
- SAWARDEKER, J. M.; SLONEKER, J. M.; JEANES, A.; 1965: Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Ann. Chem.* **57**, 1602—1604.
- SENTANDREU, R.; HERRERO, E.; MARTINEZ-GARCIA, J. P.; LARRIBA, G.; 1984: Biogenesis of the yeast cell wall. In: ROODYN, D. B. (Ed.): *Subcellular Biochemistry*. Vol. **10**, 193—235. Plenum Press, New York, London.
- VOILLEY, A.; LAMER, C.; DUBOIS, P.; FEULLAT, M.: Influence of macromolecules and treatments on the behaviour of aroma compounds in a model wine. *Amer. J. Enol. Viticult.* (Soumis pour publication.)

Eingegangen am 26. 10. 1988

M. FEULLAT
M. FREYSSINET
C. CHARPENTIER
Université de Bourgogne
Faculté des Sciences Mirande
Laboratoire d'Œnologie
BP 138
F 21004 Dijon
France