

LA PURIFICATION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES POUR L'ŒNOLOGIE. INCIDENCES SUR LA QUALITE DES VINS ROUGES ET DES VINS BLANCS.

Rose-Marie Canal-Llaubères

Novozymes France, 23, parvis des Chartrons, 33074 Bordeaux Cédex

Introduction

Les préparations enzymatiques produites par des souches de micro-organismes non modifiés génétiquement renferment de nombreuses activités enzymatiques. Ces champignons filamenteux non pathogènes sont isolés du sol où ils contribuent à la microflore. Ils ont le don d'ubiquité. Le spectre d'activités enzymatiques s'explique par l'adaptation du micro-organisme à son milieu naturel. Les souches utilisées pour l'œnologie, *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* renferment, en plus des activités pour lesquelles elles sont mises en culture (pectinases pour *A. niger*, bêta-1,3-1,6 glucanases pour *T. harzianum*), d'autres types d'activités enzymatiques telles les cellulases, bêta-glucosidases, xylanases, galactanases et protéases pour ne citer que les plus connues. Certaines activités sont indésirables dans les applications œnologiques. C'est le cas de la cinnamyl-estérase (CE), présente chez *A. niger*. En conséquence, il est apparu bien fondé d'avoir des préparations avec des niveaux d'activité CE faibles voire nuls. Les conditions de fermentation dans l'industrie sont choisies pour favoriser la production d'activités que l'on pourrait définir comme des « activités principales ». Il s'agit des activités qui caractérisent la préparation enzymatique. Cependant, le spectre enzymatique de chaque préparation dépend de la souche et des conditions de culture. Elles sont spécifiques à chaque producteur. Pour obtenir des préparations renfermant un seul type d'activité, il est nécessaire d'utiliser des micro-organismes qui sont génétiquement modifiés (MGM). Après avoir présenté l'origine, les souches et les conditions de fermentation, cet article passera en revue les activités enzymatiques responsables de la formation des phénols volatils dans les vins et le rôle de la purification sur les activités enzymatiques indésirables.

NB : nous préférons réserver le terme enzyme à une protéine ayant un pouvoir catalytique bien défini (exemple : pectine estérase). Les préparations enzymatiques renferment plusieurs enzymes ou activités enzymatiques.

Quels sont les champignons source d'enzymes?

Les souches de champignons, communément utilisées dans l'industrie des biotechnologies pour la production d'enzymes en œnologie, appartiennent à la famille des Ascomycètes (tout comme les souches de levures *Saccharomyces* sp.). Ils sont non pathogènes et colonisent les milieux naturels. *Aspergillus niger* (photo 1) est un champignon microscopique filamenteux.

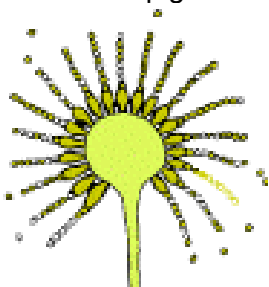


Photo 1 : Schéma d'*Aspergillus niger*

Trichoderma harzianum (photo 2) est isolé du sol dont il fait partie de l'environnement naturel. Certaines souches sont reconnues agir comme fongicide pour protéger les cultures de *Botrytis* ou de la pourriture grise (mildiou).

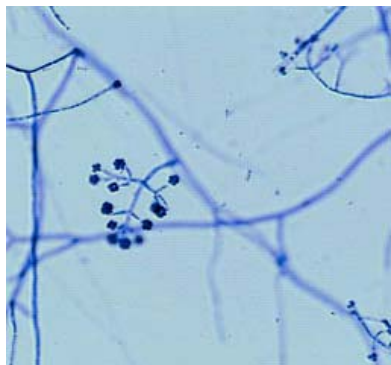


Photo 2 : *Trichoderma harzianum*

Aspergillus et *Trichoderma* sont les deux micro-organismes utilisés pour la production de préparations enzymatiques destinées à l'œnologie (pectinases, glucanases). Les autres préparations sont extraites à partir de blanc d'œuf (lysozyme) ou de culture de *Lactobacillus fermentum* (uréase). L'utilisation des préparations enzymatiques en œnologie obéit à trois niveaux de réglementation (Goutel, 1996) : communautaire, national et international, ce dernier étant basé sur les résolutions de l'OIV.

La production des préparations

Les préparations enzymatiques sont généralement produites par fermentation. Dans l'industrie, les souches sélectionnées sont cultivées sur des substrats agricoles tels la farine de soja ou l'amidon de pomme de terre. La méthode la plus couramment employée est la culture en milieu immergé. Canal-Llaubères (2002) décrit les différentes étapes de production depuis la fermentation jusqu'à l'étape finale de formulation. Le résultat de la fermentation est une préparation enzymatique renfermant plusieurs activités. Elle est dépourvue du micro-organisme producteur. Le gel d'électrophorèse d'une préparation de pectinases, représenté sur la photo 3, montre les différentes bandes qui composent la préparation. Chaque bande correspond à une activité enzymatique (de gauche à droite : puits 1, pectinase produite par une souche d'*Aspergillus niger*, puits 2 et 3, pectinase produite par une autre souche d'*A. niger*, puits 4, pectine lyase A produite par un MGM, puits 5, marqueurs de poids moléculaires)

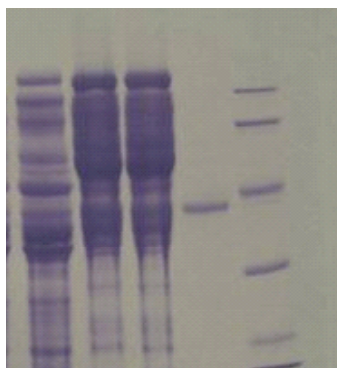


Photo 3: Gel d'électrophorèse (SDS PAGE) de préparations de pectinase produites à partir d'*Aspergillus niger* (à droite: puits 5, marqueurs de poids moléculaires).

Cette photo permet de visualiser la complexité des préparations enzymatiques obtenues à partir d'un micro-organisme non génétiquement modifié (non MGM) par rapport à une préparation enzymatique mono composant - ou enzyme - produite à partir d'un MGM. Il est important de noter que l'enzyme n'est pas modifiée. C'est le micro-organisme producteur qui est modifié par mutation génétique pour induire la synthèse d'un type d'activité enzymatique souhaité. Rappelons que l'enzyme est un catalyseur de nature protéique, produit par toute cellule vivante. Comme toutes les autres protéines, elles sont biodégradables.

Des activités enzymatiques indésirables

Parmi les activités enzymatiques connues, certaines ont été identifiées comme pouvant engendrer des déviations organoleptiques (perte de fraîcheur des vins blancs, apparition du caractère phénolé plus ou moins prononcé dans les vins blancs et les vins rouges). C'est le cas de l'activité cinnamyl-estérase, concomitante dans les préparations de pectinases produites à partir de souches d'*Aspergillus niger*. Les préparations enzymatiques produites par *Trichoderma harzianum* sont naturellement exemptes de l'activité CE. Le niveau d'activité dépend de la souche de microorganisme mais aussi des conditions de fermentation.

Purification et caractérisation de l'activité cinnamyl-estérase

Dès l'introduction des pectinases en œnologie pour la décantation des moûts au milieu des années 70, Burkhardt (1976) note que leur utilisation conduit à la perte rapide du bouquet des vins blancs allemands. Il attribue ces défauts organoleptiques à la présence d'une activité enzymatique « depsidase » produite par *Aspergillus niger* et contenue dans la préparation enzymatique utilisée. Cette activité serait susceptible d'hydrolyser les composés hydroxy-cinnamoyls tartriques des moûts blancs. Maurer (1987) qualifie cette activité de « chlorogénase » mais la définit de façon identique. De nombreux auteurs se sont penchés sur ce problème sans jamais apporter de réponse sur l'identification des substances volatiles responsables de la perte de la typicité de ces vins. Les travaux de Chatonnet et al. (1992) ont permis de mettre en évidence le rôle des préparations de pectinases sur la teneur en phénols volatils des vins. Auparavant, Chatonnet et al. (1989) avaient démontré le rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la formation de ces composés. Barbe (1995) purifie et caractérise l'activité cinnamyl-estérase. Il s'agit d'une glycoprotéine de poids moléculaire estimé à 240 000 Da, formée de deux sous unités de 120 000 Da.

La formation des phénols volatils

Les phénols volatils, vinyl- et éthyl-, contribuent à l'arôme des vins blancs et des vins rouges. A partir d'un certain seuil, ces composés peuvent apporter de la lourdeur en masquant le caractère fruité, voire déprécier les vins en développant des notes médicinales, d'encre, de gouache ou de clou de girofle (vinyl-4-phénol, vinyl-4-guaiacol) et des notes d'écurie ou de sueur (éthyl-4-phénol, éthyl-4-guaiacol). Ces composés sont issus du métabolisme des acides phénols sous l'action des microorganismes pendant la fermentation.

1. Formation des vinyl-phénols

Barbe (1995) a démontré l'évolution des teneurs en vinyl-4-phénol et en vinyl-4-guaiacol au cours de la fermentation alcoolique, avec et sans utilisation de préparations pectolytiques. La présence de vinyl-phénols est uniquement observée dans les vins blancs. Leur formation dépend de réactions enzymatiques faisant intervenir la **cinnamate décarboxylase** (CD) de la levure (Albagnac, 1975). Le gène POF1 (phenolic off-flavour) codant pour la synthèse de cette protéine a été cloné par Meaden et Taylor (1991). L'activité CD est communément présente chez

Saccharomyces et dans la plupart des souches de levures sèches actives pour l'œnologie (Grando et al., 1993). Ainsi, des souches dépourvues de l'activité cinnamate décarboxylase (ou pof) ont été sélectionnées pour éviter la formation de vinyl-phénols. Dans les vins rouges, cette activité est inhibée par les composés phénoliques du raisin rouge (Chatonnet et al., 1989). La teneur en vinyl-phénols est plus importante dans les vins blancs issus d'un traitement enzymatique à partir de pectinases présentant une activité CE, le taux d'accroissement par rapport à un vin témoin pouvant être de 50% (figure 3). Les préparations enzymatiques ne renferment pas d'activité cinnamate décarboxylase. La figure 1 montre l'hydrolyse des esters tartriques des acides cinnamiques du moût, sous l'action d'une activité secondaire de type **estérase**, présente dans les préparations enzymatiques. Dans le raisin mûr, la concentration en précurseurs est 2 à 5 fois plus élevée que celle des acides phénols libres.

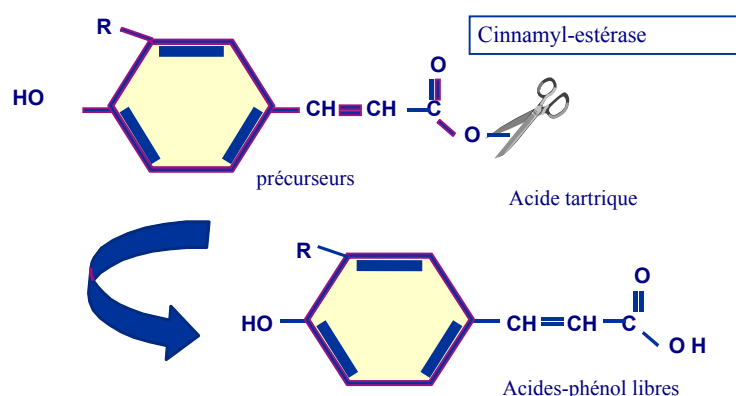


Figure 1. Formation des vinyl-phénols dans le vin blanc. Etape 1 : hydrolyse des dérivés hydroxycinnamoyl tartriques par l'activité CE (préparation de pectinases, *Botrytis cinerea*).

L'apparition des vinyl-phénols dans les vins est décrite dans la figure 2. Ces composés sont formés par la décarboxylation des acides cinnamiques libres du moût et celle des acides cinnamiques issus de l'hydrolyse des esters tartriques par une estérase présente dans les préparations pectolytiques, sous l'action de la cinnamate décarboxylase de *Saccharomyces cerevisiae*.

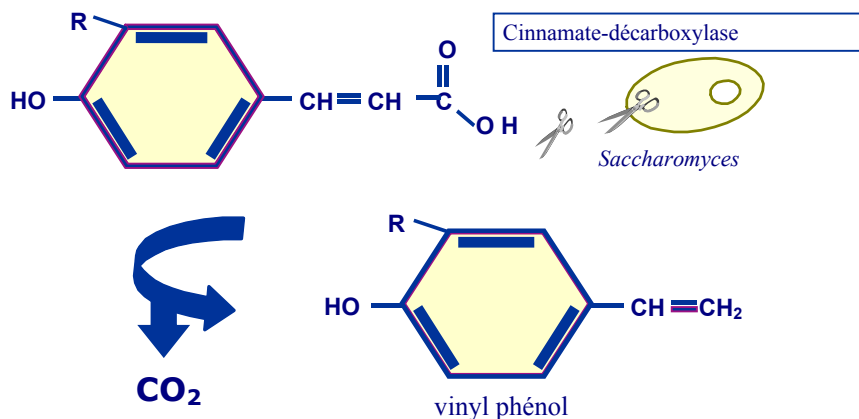


Figure 2. Formation des vinyl-phénols dans le vin blanc. Etape 2 : hydrolyse des acides cinnamiques par l'activité CD (*Saccharomyces cerevisiae*).

La mise au point de préparations pectolytiques faibles en activité CE a permis de limiter la formation des vinyl-phénols dans les vins blancs. Les résultats obtenus sur Sauvignon blanc sont présentés dans la figure 3. L'utilisation de préparations pectolytiques classiques (non purifiées de l'activité CE) pour débourber les moûts entraîne dans les vins des teneurs 2 à 4 fois plus élevées en vinyl-4-phénol par rapport à celles des vins témoins. L'utilisation de préparations à faible activité CE limite, en dessous du seuil de perception (770 µg/l), la teneur en vinyl-4-phénol du vin. Ces résultats ont été confirmés sur d'autres cépages (Muscat).

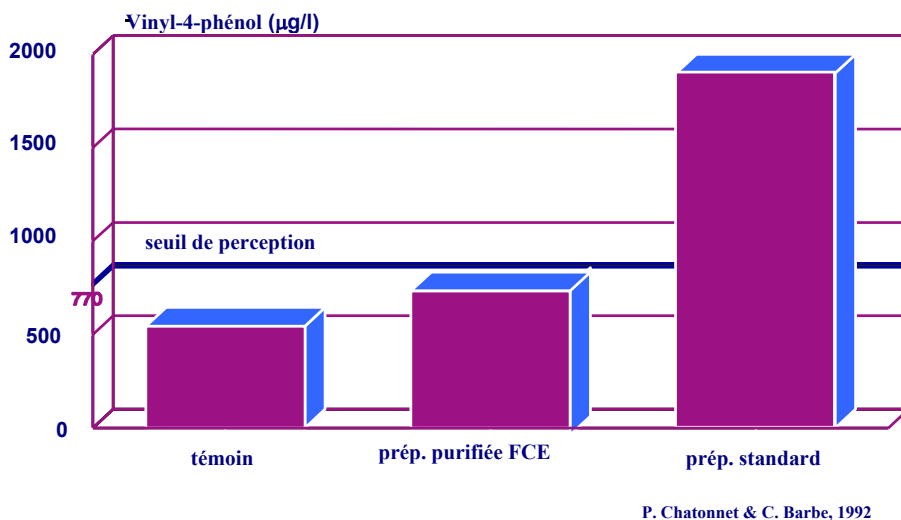


Figure 3. Incidence des préparations enzymatiques sur la teneur en vinyl-phénols dans les vins de Sauvignon (macération pelliculaire de 12 heures à 15°C sous CO₂, débourbage en présence de pectinases à 1 g/hl, NTU 100, ensemencement avec des LSA *po*⁺ à 10 g/hl)

2. Formation des éthyl-phénols

En vinification en rouge, il est courant de trouver des vins présentant le caractère phénolé. La levure *Saccharomyces* n'est pas responsable de la formation des phénols volatils, l'activité CD étant inhibée par les composés phénoliques (Chatonnet et al., 1997). Dans les vins rouges, c'est la levure de contamination *Brettanomyces* qui est responsable de leur formation, développant des notes de cuir et au delà d'un certain seuil des notes d'écurie ou de sueur. Ainsi selon Chatonnet, environ 1/3 des vins rouges de Bordeaux analysés présentent le caractère phénolé. De même Gerbaux signale que les vins de Pinot noir sont particulièrement sensibles à la contamination par *Brettanomyces*. Ainsi 50% des cuvées élevées et 25% des vins en bouteille sont contaminés. Cette levure est capable de décarboxyler les acides phénols libres du moût et ceux libérés lors de l'utilisation de pectinases (figure 1). Contrairement à *Saccharomyces*, la cinnamate décarboxylase de *Brettanomyces* n'est pas inhibée par les polyphénols. Elle permet la formation de vinyl-phénols qui sont ensuite réduits en éthyl-phénols par l'intermédiaire d'une **vinyl-phénol réductase** (VPR) (figure 4).

Les récents travaux de Gerbaux et al. (2002) montrent que certaines pratiques telles que la macération finale à chaud et l'utilisation de pectinases sur le cépage Pinot noir peuvent augmenter les risques de formation de ces composés en présence de levures de contamination et dépasser le seuil de perception (400 µg/l avec un rapport éthyl-4-phénol/éthyl-4-guaiacol de 10/1). Les auteurs montrent que

l'utilisation de pectinases non purifiées de l'activité CE augmente les teneurs en éthyl-phénol dans les vins et en particulier en éthyl-4-phénol avec des conséquences négatives sur la qualité des vins. Les préparations de pectinases FCE n'engendrent pas de modification de ces substances en comparaison au témoin. Ainsi l'utilisation de préparations pectolytiques faibles en activité CE se justifie également en vinification en rouge.

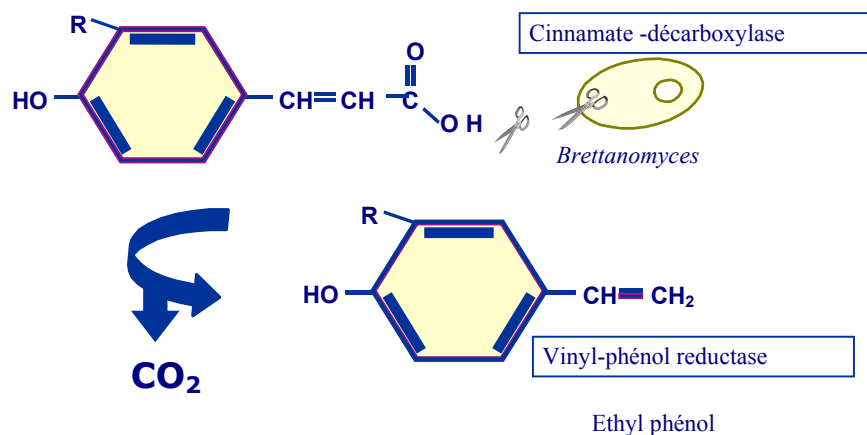


Figure 4. Formation des éthyl-phénols dans le vin rouge. Etape 2 : hydrolyse des acides cinnamiques par l'activité CD (*Brettanomyces*) et formation des vinyl-phénols. Etape 3 : réduction des vinyl en éthyl-phénols par l'activité VPR (*Brettanomyces*).

Le contrôle de l'activité CE

La littérature mentionne de nombreuses activités estérases chez *Aspergillus* sp. Elle révèle par ailleurs une large confusion dans la nomenclature des activités estérases fongiques (tannase, depsidase, chlorogénase, hydroxy-cinnamique acide ester hydrolase) et porte des appréciations diverses sur leur incidence qualitative. Après l'identification et la caractérisation de l'activité responsable de l'hydrolyse des esters tartriques des acides cinnamiques, des études ont montré qu'il est possible d'éliminer partiellement l'activité cinnamyl estérase des préparations pectolytiques par ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure de 100 000 Da. La majeure partie de l'activité CE se retrouve dans le rétentat, le perméat étant peu riche en activité CE. En production, la méthode la plus couramment employée est basée sur un traitement pH de la préparation avant sa formulation pour dénaturer l'activité CE. Ce procédé a également une incidence sur les autres activités enzymatiques et les rendements se trouvent diminués. Les travaux de Barbe (1995) ont permis de valider ce procédé de purification en déterminant une teneur limite minimale en CE pour laquelle la production de vinyl-phénols reste en dessous de son seuil de perception.

Conclusion

Les préparations enzymatiques pour l'œnologie et notamment les pectinases peuvent renfermer des activités indésirables comme la cinnamyl estérase d'*Aspergillus niger*. Sa présence peut, dans certains cas, nuire à la qualité des vins blancs et des vins rouges rouges en leur faisant perdre la fraîcheur aromatique ou en exacerbant le caractère phénolé pour atteindre des notes désagréables. Le principe de précaution a conduit les fabricants à purifier les préparations de cette activité et proposer des préparations pectolytiques faibles en activité cinnamyl estérase (FCE). Leur utilisation sur raisins (macération) ou sur moût (clarification) permet de limiter l'hydrolyse des esters tartriques des acides phénols. Ainsi la composition initiale des moûts rouges et blancs n'est pas modifiée quand le producteur met en œuvre ces préparations enzymatiques.

Bibliographie

- Albagnac G., 1975.** La décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures. Ann. Techn. Agric., 24,2, 133-141.
- Barbe C., 1995.** Recherches sur les activités estérases contaminantes des préparations pectolytiques. Applications technologiques. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux II, n°348.
- Burkhardt V.R., 1976.** Depsidspaltende Nebenwirkung von Enzympräparaten für die Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln beobachtet bei der Aufbereitung von Obst- und Traubenmaischen. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.,
- Canal-Llaubères R.M, 2002.** Le procédé de production des préparations enzymatiques. Applications à l'œnologie. Revue des Œnologues, 104, 35-37.
- Chatonnet P., Barbe C., Canal-Llaubères R.M., Dubourdiou D. et Boidron J.N. , 1992.** Incidence de certaines préparations pectolytiques sur la teneur en phénols volatils des vins blancs. J. Internat. Sci. Vigne Vin, 26, 4, 253-269.
- Chatonnet P., Dubourdiou D., Boidron J.N., 1989.** Incidence de certains facteurs sur la décarboxylation des acides phénols par la levure. Conn. Vigne Vin, 23, 1, 59-62.
- Chatonnet P., Viala C. and Dubourdiou D., 1997.** Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. Am. J. Enol. Vitic., 48, 4, 443-448.
- Gerbaux V., Vincent B. and Bertrand A., 2002.** Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. Am. J. Enol. Vit., 53, 2, 131-137.
- Goutel A.M., 1996.** Réglementation de l'utilisation des enzymes en œnologie. Rev. Française d'œnologie, 157, 25-27.
- Grando M.S., Versini G ;, Nicolini G. and Mattivi F., 1993.** Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production, Vitis, 32, 43-50.
- Maurer R., 1987.** Pektin und Pektinabbau bei der Weinbereitung. Rebe-wein, (2), 370-374.
- Meaden P.G. and Taylor N.R., 1991.** Cloning of yeast gene which cause phenolic off-flavors in beer. J. Inst. Brew., 97, 5, 353-357.