

INCIDENCES DE CERTAINES PRÉPARATIONS PECTOLYTIQUES SUR LA TENEUR EN PHÉNOLS VOLATILS DES VINS BLANCS

P CHATONNET*, Christine BARBE**, Rose-Marie CANAL-LLAUBERES**,
D. DUBOURDIEU** et JN. BOIDRON***
avec la collaboration technique de Monique PONS***

*SEGUIN-MOREAU SA Tonnellerie, 16103 Cognac (France)

**NOVO NORDISK Ferment Ltd, Neumatt, 4243 Dittingen (Suisse)

***Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II

351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

Résumé : *L'emploi de certaines préparations pectolytiques sur moût peut conduire à une teneur en vinyl-phénols élevée à l'origine d'odeurs et de goûts indésirables dans les vins blancs. Nous montrons dans ce travail que de nombreuses préparations enzymatiques issus de *Aspergillus niger* contiennent une activité du type cinnamyl-estérase (CE) capable d'hydrolyser les esters tartriques des acides hydroxycinnamiques du moût au cours de la phase pré-fermentaire, en libérant des acides trans *p*-coumarique et férulique. Sous l'action de l'activité cinnamate-décarboxylase (CD) de *Saccharomyces cerevisiae*, ces acides phénols sont transformés en vinyl-phénols correspondants au cours de la fermentation alcoolique (vinyl-4-phénol et vinyl-4-gaïacol). Le choix d'une souche de levure à faible activité CD (ZYMA-FLORE VL1) permet d'éviter l'apparition d'un caractère phénolé désagréable. Par rapport à une préparation commerciale brute, l'utilisation d'une préparation expérimentale à faible activité CE (NOVO NORDISK FERMENT Ltd) limite très significativement la synthèse de vinyl-phénols des vins sans affecter le potentiel clarifiant de la préparation enzymatique.*

INTRODUCTION

L'emploi des préparations enzymatiques s'est généralisée en œnologie à partir de 1974. De nombreuses préparations sont actuellement commercialisées en vue d'une amélioration de la clarification ou de l'extraction (couleur, arômes, précurseurs d'arômes). La majorité de ces préparations est de nature pectolytique. L'objectif principal est soit de dégrader la paroi végétale (action macérante) soit de faciliter la sédimentation (action clarifiante) des particules colloïdales issues de sa dégradation (pectines, arabanes, galactanes, arabino-galactanes). Dans le cas de vendanges pourries, les traitements mécaniques du raisin favorisent le passage d'un β -1-3-glucane synthétisé par *Botrytis cinerea* qui augmente fortement les difficultés de clarification des vins (DUBOURDIEU et RIBÉREAU-GAYON, 1977). L'utilisation d'une

préparation enzymatique du type β -glucanase permet d'améliorer la filtration de ces produits (DUBOURDIEU et al., 1981, 1985). L'utilisation de glycosidases d'origines fongiques (α -arabinosidase, β -apiosidase, α -rhamnosidase, β -glucosidase) a été envisagée dans le but d'augmenter la teneur des vins secs en composés aromatiques (terpénols volatils et composés nor-isoprénoïdes) par hydrolyse enzymatique des précurseurs d'arômes glycosylés du raisin (GUNATA et al., 1990).

Cependant, les préparations enzymatiques commerciales ne sont que peu, ou pas, purifiées. De nombreuses activités secondaires, plus ou moins désirables, sont également présentes. BURKHARDT (1976) a le premier attiré l'attention sur l'activité "depsidase" de ces préparations capables notamment d'hydrolyser les esters tartriques des acides cinnamiques des vins. SINGLETON et al. (1985) confirme que certaines préparations commerciales d'enzymes pectolytiques sont capables d'hydrolyser l'acide caféyl-tartrique. Il suppose que cette activité est due à un manque de spécificité de la pectine-méthyl-estérase (PME).

MAURER (1987) attribue plus logiquement cette activité à une chlorogénase, enzyme capable d'hydrolyser l'acide caféyl-quinique (chlorogénique). Cette enzyme est présente chez de nombreux champignons, notamment chez *Aspergillus niger* (SCHÖBEL et POLLMANN, 1980) moisissure largement utilisée pour la production industrielle des pectinases. L'activité depsidase est présentée comme particulièrement indésirable (MAURER, 1987). Les enzymes pectolytiques possédant cette activité parasite, employées sur vendange foulée ou sur moût, seraient responsables d'une diminution de la qualité aromatique et d'un vieillissement prématuré des vins blancs Allemands. Nos observations confirment cette perte de qualité organoleptique dans le cas de vins issus d'une macération ou/et d'un débouillage enzymatique. BURKHARDT (1976) attribue cette diminution de la qualité à l'hydrolyse des esters d'acides cinnamiques, molécules responsables d'après cet auteur de la "fraîcheur" des vins blancs jeunes. Cependant, les propriétés chimiques et gustatives (VERETTE et al., 1988) de ces molécules ne semblent pas pouvoir expliquer les défauts organoleptiques consécutifs à leur disparition. Leur présence est même parfois jugée indésirable en raison de leur capacité à s'oxyder dans les moûts et les vins (SINGLETON et al., 1985; CHEYNIER et al., 1986; SALGUES, 1986). Certains procédés de vinification utilisant l'hyper-oxygénation des moûts ont même été proposés (MÜLLER-SPATH, 1989) afin de limiter les risques de brunissement des vins par oxydation. D'autres encore préconisent l'élimination enzymatique des esters sur les moûts ou les vins (SOMERS et al., 1987).

Notre travail se propose de répondre à différentes questions : Quelle est l'origine exacte des modifications organoleptiques consécutives à l'utilisation des enzymes pectolytiques en vinification ? Quelles sont les enzymes et les conditions d'utilisation qui n'affectent pas la qualité des vins ?

MATÉRIELS ET METHODES

I — DOSAGE DES PHÉNOLS VOLATILS DANS LES VINS

Les phénols volatils des vins sont dosés par chromatographie en phase gazeuse et ionisation de flamme selon la méthode de CHATONNET et BOIDRON (1988).

II — ANALYSE DES COMPOSÉS HYDROXY-CINNAMIQUES DU MOUT ET DU VIN PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION

Les composés hydroxy-cinnamiques sont séparés par chromatographie liquide haute pression de phase inverse sur une colonne de silice greffée C18 (150x4,6 mm, Ultrasphère ODS 2, 3 μ , INTERCHIM). On réalise un gradient linéaire à l'aide d'une pompe VARIAN 9010 (eau/acide formique 98:2 [solvant A], méthanol/eau/acide formique 68:30:2 [solvant B]), en passant de 100 p. cent de A à 100 p. cent de B en 50 min à un débit constant de 0,8 ml /minute (élution isocratique finale 100 p. cent de B pendant 20 minutes, équilibrage 10 minutes 100 p. cent de A). On utilise un détecteur à barrette de diodes VARIAN 9065 travaillant à 321 nm pour l'enregistrement et l'intégration du chromatogramme et de 220 à 367 nm pour la réalisation des spectres UV servant à l'identification des composés. On injecte directement 10 μ l d'échantillon filtré sur membrane d'acétate de cellulose 0,45 μ .

III — RECHERCHE D'ACTIVITÉ CINNAMATE DÉCARBOXYLASE

On ajoute 1 ml d'une solution d'enzyme à 1g/l dans NaCl à 1p. cent à 10 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M pH 3,5 ou citrate de sodium 0,05 M pH 6,5, contenant 100 mg/l d'acide *trans* p-coumarique (10 μ l d'une solution à 1g/l dans l'éthanol absolu). Après 24 h d'incubation à 20 °C, 10 ml du mélange précédent sont additionnés de 1 ml de diméthyl-3,4-phénol (étalon interne) à 20 mg/l dans l'éthanol absolu et extrait par trois fois 5 ml d'éther diéthylique. Les phases organiques sont décantées statiquement, réunies, puis lavées par 10 ml de NaHCO₃ à 5 p. cent. La phase éthérée est recueillie et concentrée à froid sous azote jusqu'à 1 ml. On injecte 3 μ l en mode splitless sur une colonne de type Carbowax 20 M. La détection est effectuée en fragmentométrie de masse sur un détecteur HP-5970-b (ions m/z 107: diméthyl-3,4-phénol (e.i), 120 : vinyl-4-phénol, 150 : vinyl-4-gaïacol).

IV — MESURE D'ACTIVITÉ ESTÉRASE SUR LES ESTERS D'ACIDES PHÉNOLS

1) Activité mesurée sur jus de raisin

5 ml de jus de raisin blanc (filtré stérile 0,45 μ , pH 3,0, 160 g de sucres par litre, SO₂ libre # 20 mg par litre), conservé sous atmosphère inerte (N₂R), est additionné de 5 mg de préparation enzymatique à tester et de 100 μ l d'une solution d'acide ascorbique à 25 g par litre dans l'eau distillée. L'incubation est réalisée à 25°C, à l'obscurité et sous azote durant 24 h. La réaction est stoppée par le froid à -5°C.

L'hydrolyse des esters tartriques d'acides hydroxy-cinnamiques du jus de raisin est estimée après analyse par chromatographie liquide haute pression (cf. 2) d'après la variation des pics d'esters d'acides phénols et d'acides phénols libres par rapport à un témoin non enzymé placé dans les mêmes conditions.

2) Activité mesurée sur acide chlorogénique

On opère dans un tampon citrate de sodium 0,05 M, pH 6,5 (8,8 ml), contenant 20 mg par litre d'acide *trans* chlorogénique (acide *trans* caféyl-quinique, 0,055 mM, 200 μ l d'une solution à 1 g/l dans l'eau distillée).

On ajoute 1 ml de solution enzymatique à tester (10 g/l dans NaCl 1 p. cent) et on incube 180 minutes à 25°C. La réaction est arrêtée par le froid (-5°C). L'échantillon est conservé au froid avant d'être analysée par CLHP dans les conditions précédemment décrites

L'activité estérase est mesurée d'après la libération d'acide *trans* dihydroxy-3,4-cinnamique (acide caféique). Une unité d'activité estérase correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 μ mole/ml/h d'acide *trans* caféique dans les conditions précédemment décrites. L'unité d'activité est rapportée à la masse de préparation enzymatique étudiée (U/g).

V — PURIFICATION PARTIELLE DES ACTIVITÉS À PARTIR DE PRÉPARATIONS BRUTES

La préparation sous forme liquide (2 ml), est fractionnée par chromatographie basse pression de tamisage moléculaire sur une colonne de Séphacryl S 200 (75 x 1,5 cm, PHARMACIA) éluée par un tampon citrate de sodium 0,05 M à pH 6,5. L'activité estérase est mesurée sur l'acide caféyl-quinique (chlorogénique), par dosage de l'acide *trans* caféique libéré, les activités polygalacturonases sur polygalacturonate de sodium et pectine-estérase sur pectine de pomme d'après GRASSIN (1987).

VI — SPÉCIFICITÉ DE L'ACTIVITÉ ESTÉrase

La préparation enzymatique brute est purifiée par tamisage moléculaire sur Séphacryl S200. Les fractions possédant une activité estérase vis à vis de l'acide chlorogénique sont réunies et lyophilisées. Le lyophilisat est repris par 10 ml de NaCl 1p. cent, 1 ml de cette solution est ajouté à 9 ml de tampon citrate de sodium 0,05 M pH 6,5 contenant 1 mg/ml de substrat à tester (200 μ l d'une solution à 50 mg/ml dans l'éthanol à 95 p. cent). Après 12 h d'incubation à 25°C, les produits d'hydrolyse sont recherchés par CLPH dans les conditions précédemment décrites pour les acides phénols et par la méthode de COPPOLA et STARR (1986) pour les autres molécules.

VII — MATÉRIEL ENZYMATIQUE UTILISÉ

Les préparations enzymatiques étudiées sont des préparations commerciales ou expérimentales fournis par la société NOVO NORDISK FERMENT Ltd et dont les caractéristiques connues sont répertoriées dans le tableau I. Des préparations de références (SIGMA) ont également été testées.

VIII — MICROVINIFICATIONS AU LABORATOIRE

Les microvinifications sont réalisées au laboratoire dans des flacons de 375 ml munis d'un barboteur dans lesquels on dispose 250 ml de moût de raisin (cépage Sauvignon blanc, 170 g/l de sucres), filtré stérilement (0,45 μ). On ensemence à l'aide de levures sèches actives (20 mg/l) du type *Saccharomyces cerevisiae*. Deux souches de levures ont été utilisées: EG8C (INRA Colmar) et VL1 (Institut d'Œnologie de Bordeaux). La température de fermentation est maintenue à 25°C dans une étuve thermostatée.

TABLEAU I
Matériel enzymatique étudié

Référence des préparations	Activité principale annoncée	Formulation	Origine biologique
Préparations commerciales			
1	pectinases	granulée	<i>Asp. niger</i>
2	pectinases	granulée	<i>Asp. niger</i>
3	pectinases	granulée	<i>Asp. niger</i>
4	pectinases	poudreuse	<i>Asp. niger</i>
5	β -glucanase	granulée	<i>Trich. harzianum</i>
Préparation expérimentales			
6	pectine-estérase	liquide	<i>Asp. niger</i>
7	poly-galacturonase	poudreuse	<i>Asp. niger</i>
8	poly-galacturonase	paillettes	<i>Asp. niger</i>
9	pectine-lyase	paillettes	<i>Asp. japonicus</i>
10	β -glucosidase	liquide	<i>Asp. niger</i>
11	pectine-estérase	liquide	<i>Asp. niger</i>
12		liquide	<i>Asp. niger</i>
13		liquide	<i>Asp. niger</i>
14	poly-galacturonase	liquide incolore	<i>Asp. niger</i>
15	poly-galacturonase	liquide	<i>Asp. niger</i>
16	poly-galacturonase	liquide	<i>Asp. niger</i>
Préparations références			
Estérase EC 3.1.1.1	carboxylic-ester-hydrolase	liquide	foie de porc
Pectinase EC 3.2.1.15	poly-galacturonase	poudreuse	<i>Rhizopus sp.</i>
Pectinestérase EC 3.1.1.11	pectine estérase	solide	Tomate
Pectinestérase EC 3.1.1.11	pectine estérase	paillettes	peau d'orange
Pectinestérase purifiée	pectine estérase	poudreuse	<i>Asp. niger</i>

IX — VINIFICATIONS EN CONDITIONS RÉELLES

Les vinifications expérimentales sont conduites dans les conditions de la pratique. Le moût de Sauvignon blanc (190 g/l de sucres, pH 3,5) est obtenu par pressurage après une macération sous atmosphère de gaz carbonique durant 12 h à 15°C. Après séparation des bourbes grossières dans le cuvonn de pressurage (turbidité = 500 NTU), les différentes préparations enzymatiques sont ajoutées pendant le débouillage en barrique de 225 l à quantités égales d'activités pectolytiques.

Après 12 h à 5°C, les moûts sont soutirés dans des barriques usagées de deux ans et la turbidité réajustée à 100 NTU (turbidité du témoin non enzymé) à l'aide de bourbes fines. On enseme avec 10 g/hl de levure sèche active (*Saccharomyces cerevisiae* EG8 C). A l'issue de la fermentation alcoolique, les vins sont sulfités (50 mg/l de SO₂) et conservés sur lies. Après un mois, les vins sont analysés et dégustés.

RÉSULTATS

I — INCIDENCE DE L'ENZYMAGE SUR LA TENEUR DES VINS BLANCS EN VINYL-PHÉNOLS. ROLE DE LA SOUCHE DE LEVURE

Le dosage des phénols volatils effectués sur des vins issus de microvinifications montre (tableau II) que l'enzymage des moûts à l'aide de certaines préparations a entraîné une augmentation importante des teneurs en vinyl-phénols dans les vins fermentés par la souche EG8C alors qu'aucune variation significative n'est notée avec la souche VL1 (figure 1). L'augmentation affecte essentiellement le vinyl-4-phénol tandis que les variations du vinyl-4-gaïacol sont plus faibles et irrégulières. Dans le cas de l'enzymage sur vin, aucune variation de la concentration en vinyl-phénols n'est intervenue.

TABLEAU II
Incidence de certaines préparations enzymatiques
sur la teneur en vinyl-phénols des vins blancs

Préparations enzymatiques	Activité principale	Vinyl-4-gaïacol		Vinyl-4-phénol	
		µg/l	augmentation %	µg/l	augmentation %
Enzymage sur moût					
Témoin sur EG8	—	116	0	352	0
Préparation 1	β-glucanase	109	0	343	0
Préparation 2	pectinase	130	20	938	160
Préparation 3	pectinase	95	0	708	100
Préparation 4	pectinase	115	0	959	170
Préparation 5	β-glucosidase	92	0	1.082	204
Témoin sur VL1	—	30	0	85	0
Préparation 2	pectinase	30	0	90	0
Enzymage sur vin					
Témoin		116	0	350	0
Préparation 2	pectinase	116	0	350	0

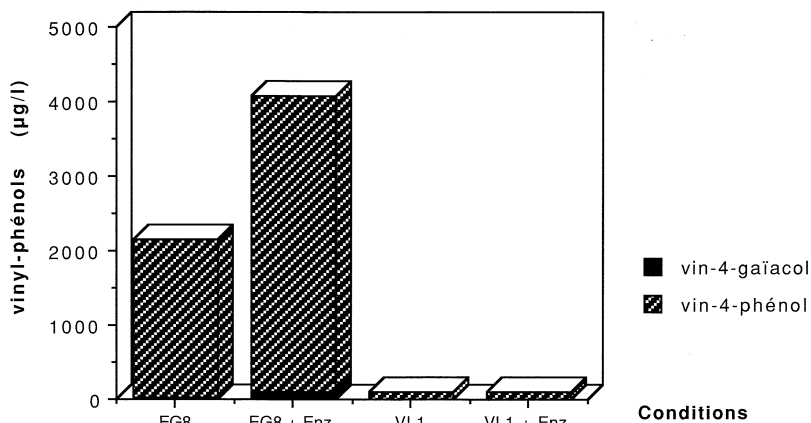


Fig. 1 — Incidence de l'enzymage sur moût et de la souche de levure sur la teneur en vinyl-phénols d'un vin blanc

II — RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE L'AUGMENTATION DES TENEURS EN VINYL-PHÉNOLS

1) Recherche d'une activité cinnamate décarboxylase

L'activité cinnamate décarboxylase (cinnamate carboxy-lyase) permet la synthèse de vinyl-phénols par décarboxylation non oxydative d'un acide hydroxy-cinnamique. Aucune activité de ce type n'a pu être détectée au bout de 24 h d'incubation à pH 3,5 ou à pH 6,5 dans les préparations enzymatiques étudiées.

2) Recherche d'une activité estérase

Un moût de raisin blanc est enzymé par différentes préparations enzymatiques purifiées ou commerciales (1 mg/ml). Après 4 h d'incubation à 20°C et à pH 3,2, les composés hydroxy-cinnamiques du moût sont analysés par CLHP à 321 nm. On constate que plusieurs pics correspondants à des esters d'acides phénols ont diminués, voire disparus, tandis que les pics d'acides phénols libres ont augmentés (figure 2).

Le tableau III montre que l'augmentation de la teneur en acide *trans* p-coumarique, pré-curseur direct du vinyl-4-phénol, provient de l'hydrolyse de ses esters tartriques. L'hydrolyse de ces esters n'est pas due aux activités pectines estérases. Il existe une activité estérase (carboxy-hydrolase) capable d'hydrolyser les esters d'acides hydroxy-cinnamiques (figure 3): acide *trans* p-coumaryl-tartrique ou coutarique, acide *trans* caféyl-tartrique ou caftarique et acide *trans* férulyl-tartrique ou fertarique. Il existe également dans certaines préparations, une activité β -glucosidase capable d'hydrolyser l'acide glucosyl-*trans*-coumaryl-tartrique en acide *trans* coutarique.

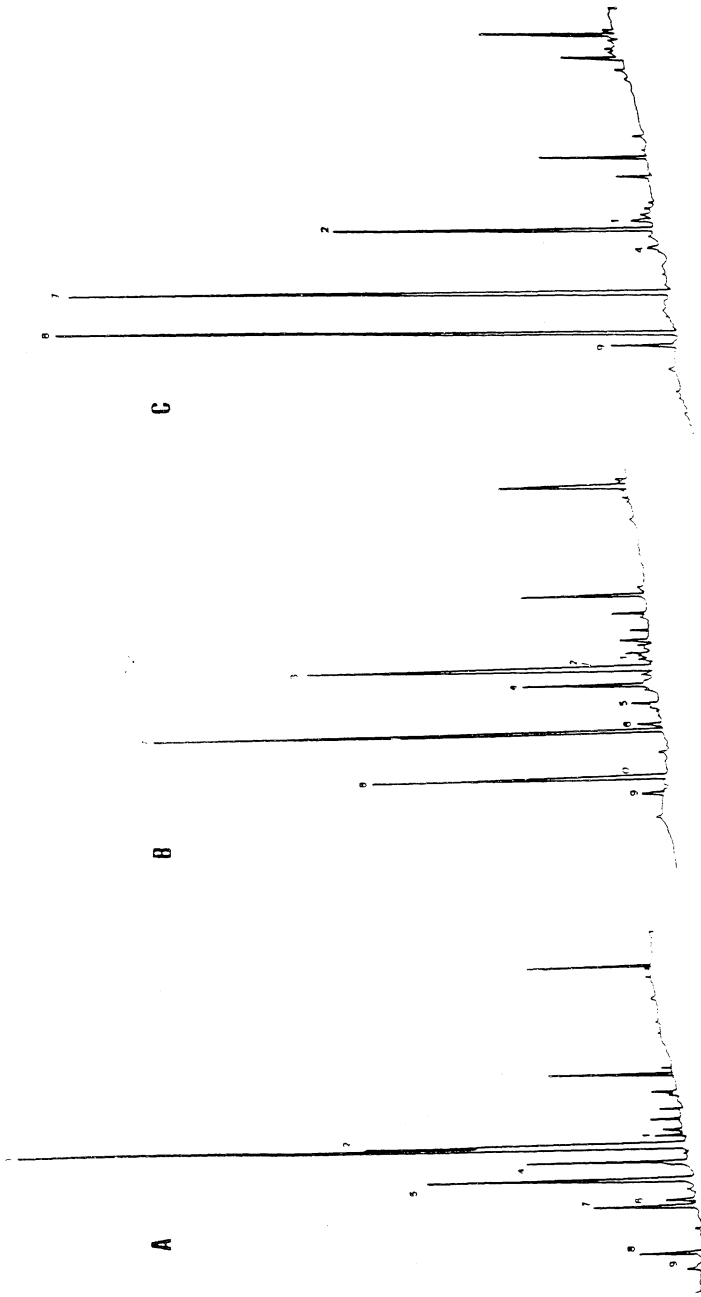


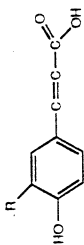
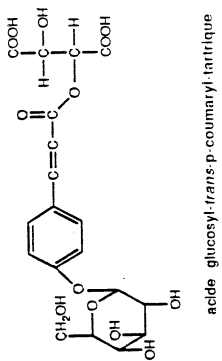
Fig. 2 — Incidence de l'utilisation d'enzymes pectolytiques sur les dérivés hydroxycinnamiques d'un moût de raisin blanc

A : témoin non enzymé

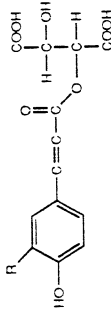
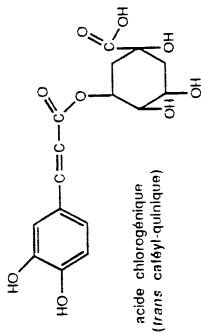
B : enzymé par une préparation de pectinases

C : enzymé par une préparation de pectinases + β -Glucosidase

- 1 : acide *cis* caféyl-tartrique (catarique); 2 : acide *trans* S-2-glutathionyl-catarique; 3 : acide *trans* catarique; 4 : acide glucosyl-*trans*-p-coumaryl-tartrique;
- 5 : acide *trans* p-coumaryl-tartrique (couatarique); 6 : acide *trans* férulyl-tartrique (feratarique); 7 : acide *trans* catélique; 8 : acide *trans* p-coumarique; 9 : acide *trans* férulique



R = H : acide *trans* *p*-coumarique (précurseur du *trans* vinyl-4-phénol)
 R = OH : acide *trans* catéchuïque
 R = OCH₃ : acide *trans* férulique (précurseur du *trans* vinyl-4-gaiacol)



R = H : acide *trans* *p*-coumaroyl tartrique (coumarique)
 R = OH : acide *trans* catéchuyl tartrique (catéchuïque)
 R = OCH₃ : acide *trans* féruloyl tartrique (féruarique)

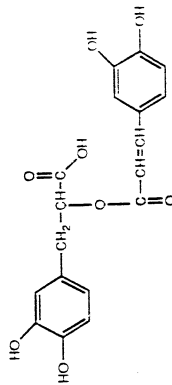


Fig. 3 — Structure des acides hydroxy-cinnamiques substrats de l'activité estérase des préparations pectolytiques

TABLEAU III
Incidence de différentes activités enzymatiques
sur les composés hydroxy-cinnamiques du moût de raisin

Substrats hydroxy-cinnamiques (Δ %)	Témoïn non enzymé	Estérase Foie de porc	Pectines estérases de référence				Préparations	
			Tomate	<i>Rhizopus</i> sp.	Orange	<i>Aspergillus</i> sp.	2 Asp. niger	6 Asp. niger
trans caitarique	0	-17	-14	-8	-10	-10	-89	-90
glucosyl-trans-coutarique	0	-15	-11	-19	-9	-15	-100	-42
trans p-coutarique	0	-8	0	0	-5	-27	-54	-42
Produits (Δ %)								
trans catéique	0	0	0	0	0	0	158	22
trans p-Coumarique	0	0	0	0	0	19	386	103

III — PURIFICATION PARTIELLE DE L'ACTIVITÉ ESTÉRISE À PARTIR D'UNE PRÉPARATION PECTOLYTIQUE

Une purification partielle de l'activité estérise est effectuée à partir d'une préparation enzymatique à caractère pectolytique produite par *Aspergillus niger*. La préparation est fractionnée par chromatographie basse pression de tamisage moléculaire sur une colonne de Séphacryl S 200 (figure 4). Les protéines possédant une activité estérise mesurée sur acide caféyl-quinique (chlorogénique), possèdent un poids moléculaire de 230.000. Les activités polygalacturonases et pectine-estérises sont nettement séparées de l'estérise en raison de poids moléculaires beaucoup plus faibles (25 à 50.000).

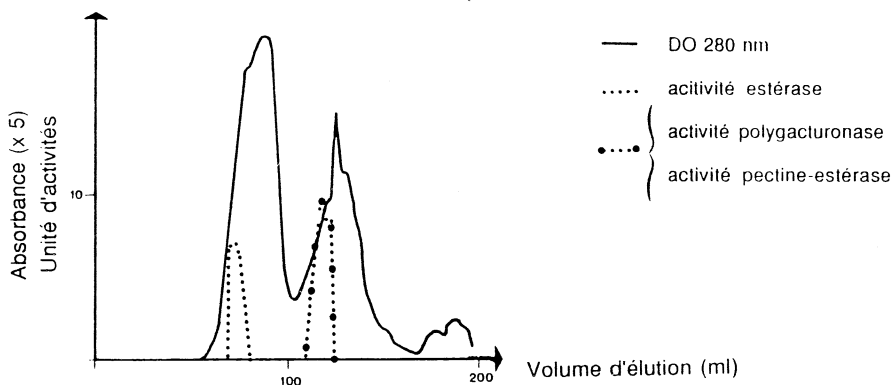


Fig. 4 — Purification partielle d'une activité estérise à partir d'une préparation pectolytique commerciale par tamisage moléculaire (Séphacryl S 200)

TABLEAU IV

Spécificité de l'activité estérise partiellement purifiée à partir d'une préparation pectolytique commerciale (CLBP sur Séphacryl S200)

Substrats	Activité estérise
acide digallique	-
gallate de méthyle	-
acide ellagique	-
acide caféyl-dihydroxy-3,4-phényl-lactique	+ +
acide caféyl-quinique	+ +
acide trans caféyl-tartrique	+ +
acide trans p-coumaryl-tartrique	+ +
acétate de naphthyle	-
fumarate d'éthyle	-
maléate de diéthyle	-

(+/- : capacité à hydrolyser l'ester testé)

IV — SPÉCIFICITÉ DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASE PARTIELLEMENT PURIFIÉE

Le tableau IV montre que l'activité estérase purifiée à partir d'une préparation pectolytique brute obtenue à partir d'*Aspergillus niger* est spécifique des acides cinnamiques. Il s'agit par conséquent d'une activité du type cinnamyl-estérase.

V — INCIDENCE DE DIFFÉRENTS FACTEURS SUR L'ACTIVITÉ CINNAMYL-ESTÉRASE DES PRÉPARATIONS PECTOLYTIQUES

Le pH optimum de l'activité cinnamyl-estérase se situe au voisinage de pH 6,5 (figure 5), la température optimum d'activité est de 30 °C, elle est totalement inactive à -5°C (figure 6). L'activité estérase brute ou purifiée est rapidement inhibée, quelque soit le substrat testé, au delà de 3 p. cent vol. d'éthanol (figure 7).

VI — ACTIVITÉ CINNAMYL-ESTERASE DE DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS PECTOLYTIQUES ET ACCROISSEMENT DES TENEURS EN VINYL-PHÉNOLS DES VINS

La figure 8 présente l'activité cinnamyl-estérase de différentes préparations enzymatiques commerciales et expérimentales, mesurée sur acide chlorogénique et acide *trans* coutarique, ainsi que l'augmentation relative des teneurs en vinyl-phénols après fermentation d'un moût enzymé à la dose de 10 mg/l par une levure présentant une forte activité cinnamate décarboxylase (*Saccharomyces cerevisiae* EG8C). La teneur en vinyl-phénols des vins enzymés sur moût est bien corrélée avec l'activité cinnamyl-estérase des préparations mesurée sur l'acide *trans* coutarique et sur l'acide chlorogénique, mais avec un moins bon coefficient de corrélation pour ce dernier.

VII — MISE AU POINT D'UNE PRÉPARATION PECTOLYTIQUE À FAIBLE ACTIVITÉ-CINNAMYL-ESTÉRASE

Le tableau V regroupe les analyses de différents vins vinifiés en grandeur réelle à partir d'un même moût de Sauvignon blanc ensemencé par *Saccharomyces cerevisiae* EG8C. On constate que l'utilisation de la préparation expérimentale à faible activité cinnamyl-estérase, à un niveau d'activités pectolytiques identique à celui de la préparation brute, permet d'obtenir une réduction très significative de la teneur en vinyl-4-phénol du vin. L'utilisation de la préparation enzymatique brute conduit à la production d'un vin blanc présentant un caractère "phénolé" (Σ vinyl-phénols > 725 μ g/l).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'action des préparations pectolytiques sur la teneur en vinyl-phénols des vins blancs n'est pas liée à la présence d'une activité cinnamate décarboxylase. Contrairement aux hypothèses de certains auteurs (SINGLETON *et al.*, 1985; SALGUES, 1986), elle n'est pas non plus interprétable par un défaut de spécificité des pectine-méthyl-estérases (EC 3.1.1.11).

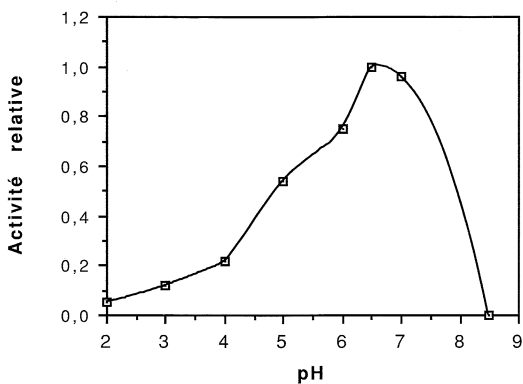


Fig. 5 — Incidence du pH sur l'activité cinnamyl-estérase des préparations pectolytiques

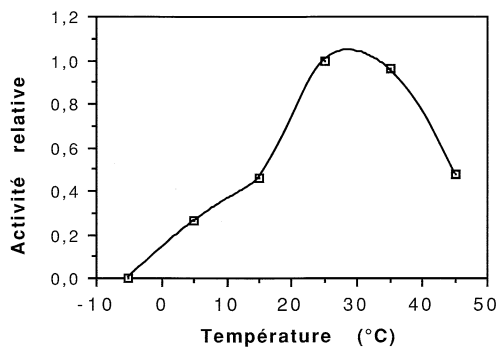


Fig. 6 — Incidence de la température sur l'activité cinnamyl-estérase des préparations pectolytiques

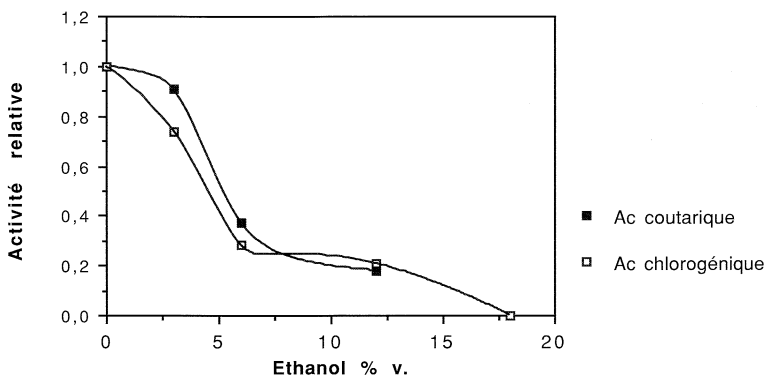


Fig. 7 — Incidence de l'éthanol sur l'activité cinnamyl-estérase des préparations pectolytiques

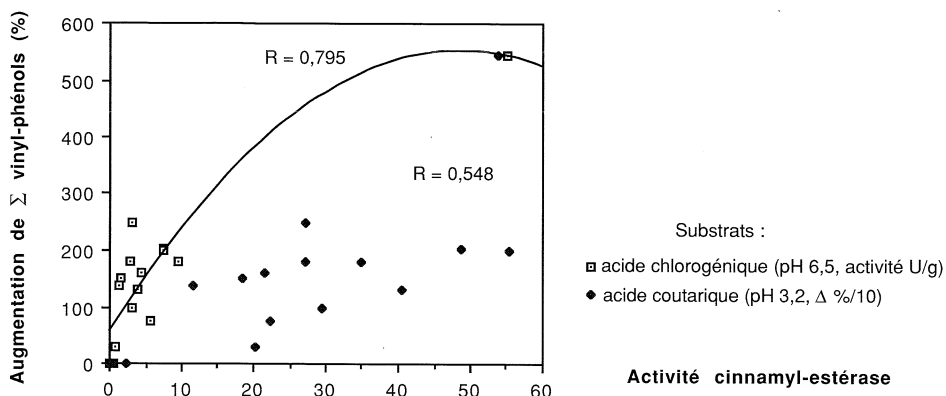


Fig. 8 — Corrélation entre activité cinnamyl-estérase mesurée sur différents substrats et enrichissement en vinyl-phénols dans les vins

TABLEAU V

Mise au point d'une préparation pectolytique à faible activité cinnamyl-estérase. Incidence sur la teneur en vinyl-phénols des vins

Vins	Vinyl-4-gaïacol		Vinyl-4-phénol		Activité CE (U/g)	FDU* 20°C calculé
	µg/L	augmentation %	µg/L	augmentation %		
Témoin	192	0	545	0	-	-
Enzymage par une préparation commerciale	218	13,5	1900	248	12	6200
Enzymage par une préparation expérimentale	169	0	795	45	1,9	7800

*FDU = Ferment Depectinisation Unit

Les préparations étudiées contiennent une enzyme de type estérase, active sur les esters tartriques d'acides cinnamiques du moût de raisin. Cette activité est proche de celle décrite par SCHÖBEL et POLLMAN (1980b); mais contrairement à ces auteurs, l'activité que nous avons étudiée n'est pas spécifique de l'acide chlorogénique. Il s'agit par conséquent d'une activité du type cinnamyl-estérase. Une activité du même type a déjà été décrite par OKAMURA *et al.* (1982) chez *Aspergillus japonicus*. Certaines préparations présentent également une activité β-glucosidase capable d'hydrolyser l'acide glucosyl-*trans*-coutarique en acide *trans*-coutarique, hydrolysable à son tour en acide *trans*-p-coumarique par l'activité estérase.

Exceptée une préparation issue de *Trichoderma harzianum*, toutes les préparations étudiées issues de *Aspergillus sp.* présentent une activité cinnamyl-estérase, facilement mesurable en utilisant l'acide chlorogénique comme substrat.

Le poids moléculaire et le pH optimum de l'activité sont identiques à ceux déterminés par SCHÖBEL et POLLMAN (1980 a et b). En revanche, la température optimale que nous avons mesurée est plus faible (30°C) que celle déterminée par cet auteur (45°C). Cette activité est capable d'hydrolyser les esters tartriques des acides hydroxy-cinnamiques du moût de raisin à pH 3,0 et en absence d'éthanol. Cette enzyme n'est par conséquent active que durant la phase pré-fermentaire, stade d'emploi courant des préparations pectolytiques utilisées comme agent de clarification ou de macération.

Contrairement aux interprétations fournies par BURKHARDT (1976) et MAURER (1987), le principal inconvénient d'utilisation d'une préparation contenant une activité cinnamyl-estérase ne réside pas directement dans la disparition des esters hydroxy-cinnamiques et la libération d'acide phénols libres, mais plutôt dans le danger d'apparition d'un caractère "phénolé" lié à un excès de vinyl-phénols (principalement de vinyl-4-phénol) après fermentation. Ces molécules de phénols volatils sont responsables d'odeurs et de goûts pharmaceutiques désagréables lorsque les concentrations dépassent 700 µg/l (seuil limite représentant le seuil de perception dans un vin blanc standard pour un mélange vinyl-4-gaïacol/vinyl-4-phénol 1:1, CHATONNET, 1991). A l'inverse de SOMERS et al. (1987), nous ne pouvons recommander l'élimination enzymatique des esters d'acides hydroxy-cinnamiques sur moûts. En effet, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable de transformer les acides *trans* p-coumarique et férulique en vinyl-phénols correspondants au cours de la fermentation alcoolique. Ainsi, en présence d'activité cinnamyl-estérase, les esters hydroxy-cinnamiques du moût (acide *trans* fertarique et *trans* coutarique) sont hydrolysés en acides *trans* p-coumarique et férulique, substrats de l'activité cinnamate décarboxylase de la levure et transformés en vinyl-phénols odorants. L'enrichissement en précurseurs décarboxylables par la levure sera d'autant plus important que la température d'incubation sera élevée, le moût riche en précurseurs et nécessitant une clarification assistée par enzymage (faible activités pectinases endogènes), conditions souvent réunies sous climat chaud et sec.

L'activité cinnamyl-estérase n'est gênante que pour la vinification des vins blancs, elle est sans conséquence dans le cas des vins rouges en raison de l'inhibition de l'activité cinnamate décarboxylase de la levure par les tanins catéchiques du raisin (CHATONNET et al., 1989, DUBOURDIEU et al., 1989). Dans le cas d'utilisation de pectinases riches en cinnamyl-estérase, le choix d'une souche de levure à faible activité cinnamate décarboxylase (ZYMAFLORE VL1) permet de limiter considérablement le risque d'obtention d'un vin blanc phénolé.

L'élimination de la majeure partie de l'activité cinnamyl-estérase d'une préparation enzymatique déjà existante par un procédé protégé par NOVO NORDISK FERMENT Ltd., permet de limiter considérablement l'enrichissement en vinyl-phénols des vins blancs sans affecter son potentiel pectolytique.

Une production industrielle d'enzyme clarifiante et macérante, sans action néfaste sur la qualité des vins blancs, est désormais envisageable à court terme.

Manuscrit reçu le 7 mai 1992; accepté pour publication le 7 août 1992

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BURKHARDT R., 1976. Despsidspaltende Nebenwirkung von Enzympräparaten für die Be- und Verarbeitung von Ledensmitteln, beobachtet bei der Aufbereitung von Obst- und Traubenmaischen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **72**, n°12, 417-420.
- CHATONNET P. et BOIDRON J.N., 1988. Dosage de phénols volatils dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. *Sciences des Aliments*, **8**, 479-488.
- CHATONNET P. DUBOURDIEU D. et BOIDRON J.N., 1989. Incidences de certains facteurs sur la décarboxylation des acides phénols par la levure. *Connaissance Vigne Vin*, **23**, n°1, 59-62.
- CHATONNET P., 1991. Recherches sur l'origine de certains phénols volatils dans les vins. *DEA Œnologie-Ampélogie*, Université de Bordeaux II.
- CHEYNIER V., OSSE C. et RIGAUD J., 1986. Oxydation of grape juice in model solutions. *J. Food Science*, **53**, n°6, 1729-1760.
- COPPOLA E.D. et STARR M.S., 1986. Liquid chromatographic determination of major organic acids in apple juice and cranberry juice cocktail : collaborative study. *J.A.O.A.C.*, **69**, n°4, 594-597.
- DUBOURDIEU D. et RIBÉREAU-GAYON P., 1977. Observations sur les difficultés de clarification des vins de vendanges pourries. *CR Acad Agric.*, **63**, n°4, 290-296.
- DUBOURDIEU D., VILLETAZ J.C., DESPLANQUES C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1981. Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à la clarification des vins issus de raisins pourris. *Connaissance Vigne Vin*, **15**, n°3, 161-177.
- DUBOURDIEU D., VILLETAZ J.C., DESPLANQUES C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1985. Investigation of an industrial β -D-glucanase from *T. harzianum*. *Carb. Res.*, **144**, 277-287.
- DUBOURDIEU D., CHATONNET P., DARRIET P. et BOIDRON J.N., 1989. Intervention de systèmes enzymatiques de *Saccharomyces cerevisiae* sur certains précurseurs d'arômes du raisin in "Actualités Œnologiques 89". RIBÉREAU-GAYON P. et LONVAUD A., Ed. Dunod, Paris, 151-159.
- GRASSIN C., 1987. Recherches sur les enzymes extracellulaires sécrétées par *Botritis cinereas* dans la baie de raisin. Applications œnologiques et phytopathologiques. *Thèse de Doctorat 3^e cycle*, Université de Bordeaux II.
- GUNATA Z., DUGELAIS I., SAPIS J.C., BAUMES R. et BOYONOVE C., 1990. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *Connaissance Vigne Vin*, **24**, n°3, 133-144.
- MAURER R., 1987. Pektin und pektinabau bei der weinbereitung. *Rebe-Wein*, Octobre 1987, 370-374.

- MULLER-SPATH H., 1989. Vinification en blanc. Influence de l'oxygène et de la température avant la fermentation. in "Actualités Œnologiques 89", RIBEREAU-GAYON P. et LONVAUD A., Ed. Dunod, Paris, 139-145.
- OKAMURA S. et WATANABE M., 1982. Purification and properties of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1839-1848.
- SALGUES M., 1986. Recherches sur la dégradation enzymatique des dérivés hydroxycinnamiques des moûts de raisin blanc. Incidence de certains composés soufrés. Applications technologiques. *Thèse de Docteur-Ingénieur*, ENSAM.
- SCHÖBEL B. et POLLMAN W., 1980 a. Isolation and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Z. Naturforsch.*, 35c, 209-212.
- SCHÖBEL B. et POLLMAN W., 1980 b. Weitere Charakterisierung einer Chlorogensäure-Hydrolase aus *Aspergillus niger*. *Z. Naturforsch.*, 35c, 699-701.
- SINGLETON V.L., SALGUES M., ZAYA J. and TROUSDALE E., 1985. Tartaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am J. Enol Vitic.*, **36**, n°1, 50-56.
- SOMERS T.C., VERETTE E., POCOCK K.F., 1987. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera* : changes during white vinification and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.*, **40**, 67-78.
- VERETTE E., NOBLE A.C. and SOMERS T.C., 1988. Hydroxycinnamates of *Vitis vinifera* : sensory assessment in relation to bitterness in white wines. *J. Sci. Food Agric.*, **45**, 267-272.