

PREMIERES OBSERVATIONS SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DEVELOPPEES DANS LE MOUT DE RAISINS PAR CERTAINS CHAMPIGNONS FILAMENTEUX.

Maria Vitoria SAN ROMÃO ET Maria Filomena SILVA ALEMÃO
Estação Vitivinícola National,
DOIS PORTOS, 2575 RUNA, (Portugal)

INTRODUCTION

L'existence dans le moût de raisins d'activités enzymatiques est depuis longtemps connue. L'invertase, découverte en 1833 par PERSOZ, est certainement la mieux étudiée ; elle est liée aux débris cellulaires de la pulpe. Très stable, on la retrouve dans les vins dans lesquels elle se maintient au cours de la conservation (USSEGLIO-TOMASSET, 1983). Les enzymes pectolytiques hydrolases et lyases, jouent un rôle techniquement important dans la clarification des moûts et des vins (VILLETTAZ, 1983). Les carbohydrolases, amylases, arabinosidases, galactosidases, glucosidases, xylosidases, glucanases interviennent notamment dans les modifications préfermentaires de la composition du moût. C'est ainsi que des glucosidases de type β -D-glycosidases sont responsables de la libération de terpénols à partir d'hétérosides auxquels ils sont liés dans les moûts de muscat (CORDONNIER et BAYONOVE, 1974, BAYONOVE et *al.*, 1983 ; WILLIAMS et *al.*, 1982). Les catécholoxydases ont fait l'objet de nombreux travaux depuis la fin du siècle dernier (LABORDE, 1896, MAYER, 1978). Les protéases du raisin se retrouvent dans le moût, actives à ces pH, localisées dans les débris de pulpe (CORDONNIER, 1968, 1970 ; FEUILLAT et BERGERET, 1967).

Les enzymes des moûts de raisins parasités par *Botrytis cinerea* ont été particulièrement étudiées par l'école bordelaise. Ceux-ci contiennent, outre une tyrosinase, une laccase entièrement soluble, résistante à l'action des tanins et de l'anhydride sulfureux, responsable des phénomènes oxydatifs dans les vins issus de raisins pourris (DUBERNET, 1974). *Botrytis cinerea* secrète, en outre, une β -(D - 3) glucanase capable d'hydrolyser la cinéréane, substance de réserve exocellulaire de ce champignon (DUBOURDIEU, 1982). Il synthétise également une estérase exocellulaire, particulièrement stable dans les conditions de la vinification (20 °C, pH 3,4) capable d'hydrolyser les esters formés par la levure au cours de la fermentation (DUBOURDIEU et RIBEREAU-GAYON, 1983). Une activité N-acetyl-

glucoseaminidase a été aussi identifiée dans les milieux de culture de *Botrytis* et les raisins pourris (KOH, 1985).

Cependant, sur les vendanges atteintes de pourriture grise, d'autres micro-organismes de nature fongique se développent, notamment *Penicillium*, *Mucor* (PUCHEU-PLANTE et SEGUIN, 1978, KOVAC et NZBASKI, 1983).

Des travaux antérieurs (SAN ROMAO et al. 1985) ont montré l'incidence à l'égard des bactéries lactiques du vin des précipités alcooliques des moûts parasités par divers champignons.

Dans ce travail, on étudie la composition macro-moléculaire de ces précipités et quelques-unes des activités enzymatiques qui leur sont associées. On examine ensuite leurs implications technologiques.

MATERIELS ET METHODES

Les souches de *Botrytis cinerea*, *Penicillium frequentans* et *Mucor* appartiennent à la collection de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux.

Le milieu de culture est un moût de raisins limpide (pH 3,3, sucre 180 g par litre) stérilisé à 100 °C pendant 30 minutes. Après ce traitement, il est totalement dépourvu d'activités enzymatiques.

Après trois semaines d'incubation à 20 °C, dans des fioles coniques de 2 litres contenant 500 ml de moût, on recueille le moût de culture de chacun des champignons par centrifugation.

Le moût « naturellement » pourri est obtenu par deux pressurages, à 300 kg/cm², de raisins pourris cueillis dans les conditions de la pratique.

I — EXTRACTION DES POLYSACCHARIDES

Chaque moût parasité est additionné de 5 volumes d'éthanol à 95 p. 100, après élimination ou non des glucanes si le moût en possède, par précipitation préalable avec 0,5 p. 100 d'éthanol en volume.

Le précipité formé est recueilli par centrifugation à 6 000 g pendant 15 minutes. Il est dissous dans un volume d'eau tiède égal à la moitié du volume de moût dont il provient. Précipité à nouveau de cette solution par addition de 5 volumes d'éthanol et recueilli par centrifugation, l'extrait est dissous dans un faible volume d'eau et lyophilisé.

On obtient par litre de culture des poids d'extraits variables selon le champignon :

<i>Botrytis cinerea</i>	500 mg
<i>Penicillium frequentans</i>	600 mg
<i>Mucor</i>	30 mg
Moût pourri	1 500 mg

II — FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS

Le fractionnement est réalisé par filtration de la solution de l'extrait sur gel de Sepharose CL-4B qui a la capacité de séparer les protéines de

poids moléculaires compris entre 6×10^4 et 20×10^6 et les polysaccharides de poids moléculaires compris entre 3×10^4 et 5×10^4 (dimensions de la colonne $45 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) ; débit 9 ml/h ; éluant : chlorure de sodium 1 M . Des volumes de $1,5 \text{ ml}$ d'éluat sont recueillis dans un tube. Le bleu de dextrane d'un poids moléculaire inférieur au poids moléculaire d'exclusion de la colonne, possède un volume d'éluat de 18 ml .

A partir de chacun des extraits trois fractions : a, b et c sont séparées, correspondant à des volumes d'éluats variables, (figures 1 à 4).

Les volumes des tubes correspondant à une même fraction sont rassemblés ; le chlorure de sodium en excès est éliminé par passage sur colonne de Sephadex G-25 ; on élue à l'eau et on lyophilise.

La fraction a, de chacun des extraits, redissoute dans une solution de chlorure de sodium $0,5 \text{ M}$, est passée sur gel de Sephacryl S 100 qui assure la séparation des substances de poids moléculaire de 5×10^5 à $> 10^8$ (dimensions de la colonne $1 \times 70 \text{ cm}$) ; débit : 10 ml/h ; éluant : chlorure de sodium $0,5 \text{ M}$; des volumes de $1,66 \text{ ml}$ d'éluat sont recueillis dans chaque tube.

Les fractions b et c sont passées sur gel de Sephadex G-100 qui a la capacité de séparer les protéines de poids moléculaires compris entre 4×10^3 et 15×10^4 et les polysaccharides de poids moléculaires compris entre 1×10^3 et 10^4 (dimensions de la colonne $1 \times 60 \text{ cm}$) ; débit 6 ml/h ; éluant : chlorure de sodium $0,5 \text{ M}$; des volumes de 1 ml d'éluat sont recueillis dans chaque tube.

A la sortie de chaque colonne la détection des protéines est effectuée par la mesure de l'absorbance à 280 nm . On dose les sucres par réaction à l'anthrone en milieu sulfurique à chaud et mesure de l'absorbance à 620 nm .

Dans les extraits totaux et dans chaque fraction, on dose les protéines par la méthode de Lowry modifiée par Hubert, les sucres par l'anthrone sulfurique.

On détermine également dans les mêmes échantillons les activités enzymatiques suivantes : α -glucosidase, α -galactosidase β -N-acetylglucosaminidase (DREYFUS et POENARU, 1975), β -glucosidase (PETERS et *al.*, 1975) α -mannosidase (POENARU et DREYFUS, 1978) β -glucuronidase (GLASER et SLY, 1973), α -fucosidase (ROBINSON et THORPE, 1974) et β -galactosidase (GALJARD, 1980). Les substrats utilisés sont dérivés de la 4-méthyl-umbelliférone. On mesure la 4-méthyl-umbelliférone libérée par fluorescence à 445 nm après excitation à 365 nm .

Les activités ont aussi été mesurées par la même méthode, à la sortie de la colonne de Sépharose et Séphadex (fractions b et c).

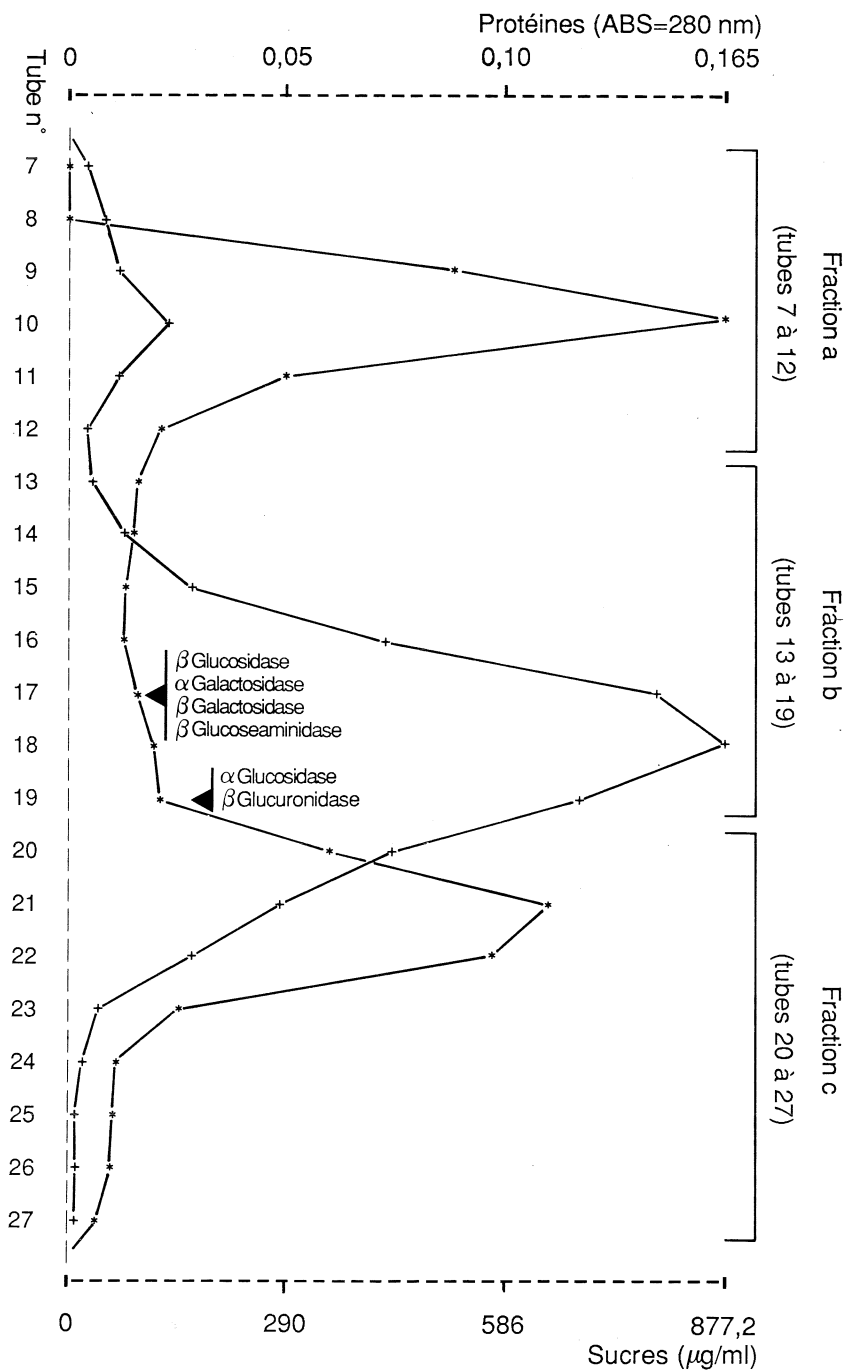


Fig. 1 — Fractionnement sur Sépharose CL-4B d'un extrait alcoolique de *Botrytis cinerea*.

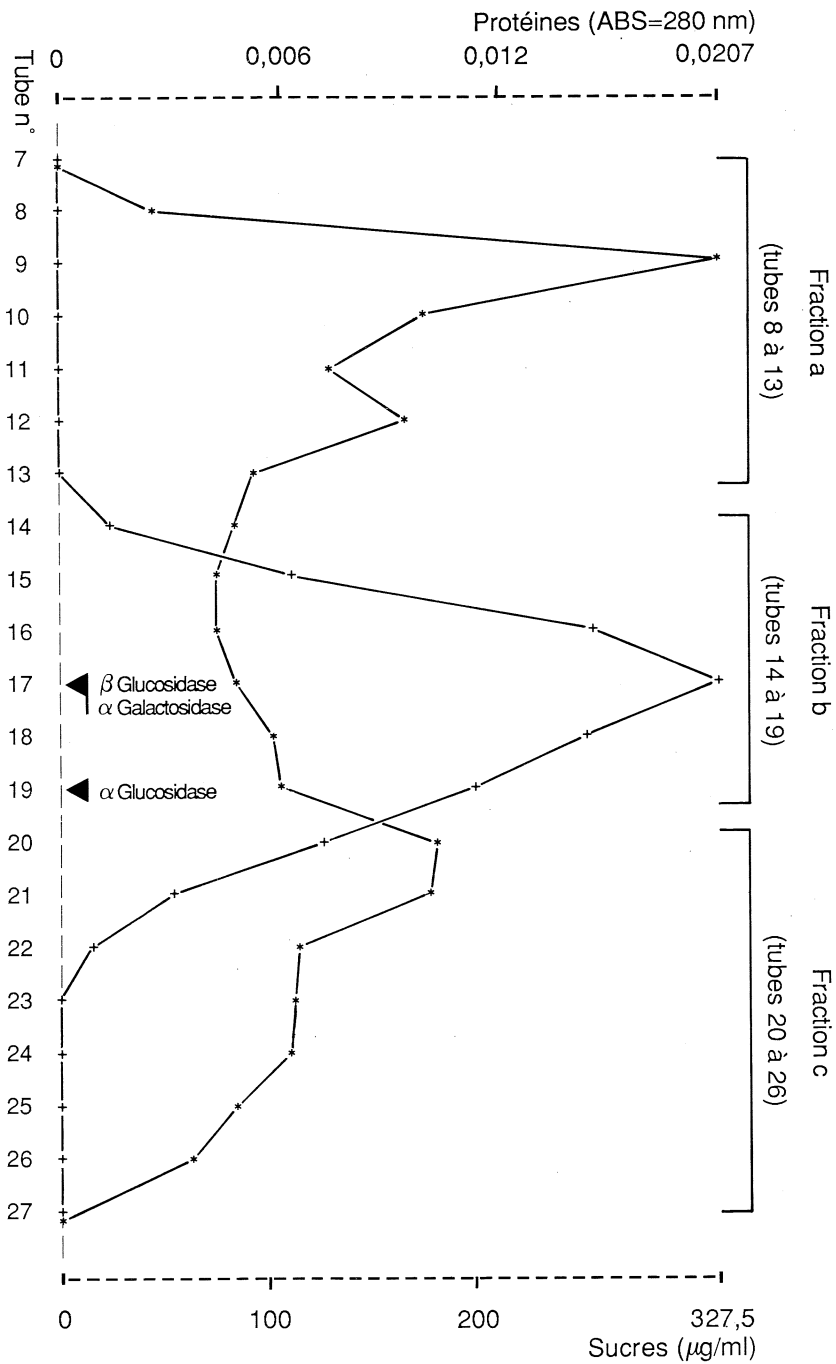


Fig. 2 — Fractionnement sur Sépharose CL-4B d'un extrait alcoolique de *Mucor*.

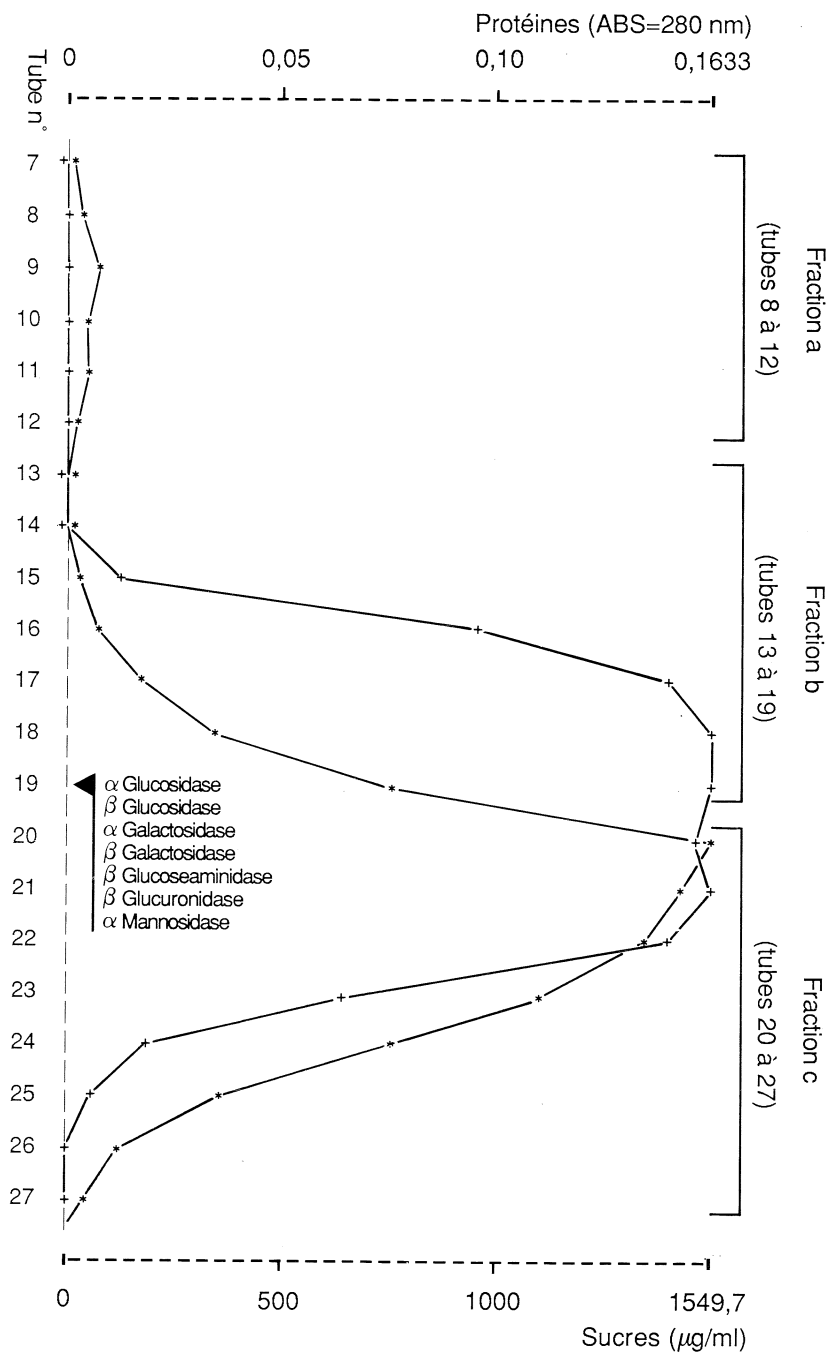


Fig. 3 — Fractionnement sur Sépharose CL-4B d'un extrait alcoolique de *Penicillium*.

RESULTATS

I — COMPOSITION AZOTEE ET POLYSACCHARIDIQUE DES SUBSTANCES PRECIPITABLES PAR L'ALCOOL A PARTIR DES MOUTS DE CULTURE DE DIVERS CHAMPIGNONS FILAMENTEUX.

Les teneurs globales en azote et en polysaccharide des précipités alcooliques des moûts après développement des champignons sont variables (tableau I) ; celui de *Penicillium frequentans* est le plus riche en les deux éléments.

TABLEAU I

Quelques activités carboxylases rencontrées dans les précipités par l'alcool, obtenus à partir de moût de culture de quelques champignons filamenteux. (nmol/h/mg de protéines et par litres de moût).

		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Mucor</i>	Moût pourri
Glucosidase	α	7 450	416	traces	9 509
	β	1 728	1 910	8	3 484
Galactosidase	α	345	1 842	1 739	26 433
	β	3 790	2 805	2	293
Glucoseaminidase β		41 122	6	< 1	7 756
Glucuronidase β		121	3 146	nd	16
Mannosidase β		60	484	< 1	48

Les figures 1, 2 et 3 montrent la répartition globale de ces substances selon leurs poids moléculaires, pour chacun des champignons. On voit que la répartition est sensiblement différente d'un champignon à l'autre et que les polysaccharides et les protéines se trouvent en mélange dans certaines fractions.

Dans les diverses fractions des éluats on distingue selon le champignon impliqué :

- **Fraction a** (protéines de poids moléculaire de 5×10^3 à $> 10^6$) :
 - *Botrytis cinerea* — 2 groupes majeurs de protéines (tubes 12 et 26).
 - *Mucor* — 3 groupes majeurs de protéines (tubes 10, 25 et 41).
 - *Penicillium frequentans* — 3 groupes majeurs de protéines (tubes 12, 26 et 44).

- **Fraction b** (protéines de poids moléculaire de 4×10^3 à 15×10^4)
 - *Botrytis cinerea* — 2 groupes majeurs de protéines (tubes 15 et 44).
 - *Mucor* — 3 groupes majeurs de protéines (tubes 8, 34 et 41).
 - *Penicillium frequentans* — 3 groupes majeurs de protéines (tubes 10, 25 et 37).
- **Fraction c** (protéines de poids moléculaire de 4×10^3 à 15×10^4)
 - *Botrytis cinerea* — 2 groupes majeurs de protéines (tubes 16 et 42).
 - *Mucor* — 2 groupes majeurs de protéines (tubes 12 et 36).
 - *Penicillium frequentans* — 3 groupes majeurs de protéines (tubes 11, 25 et 37).

Les fractions b et c contiennent, outre des protéines, les quantités les plus importantes de polysaccharides.

En ce qui concerne *Botrytis cinerea* et *Penicillium frequentans*, les fractions b et c contiennent des protéines de même poids moléculaire.

Ces résultats suggèrent que chaque champignon libère dans le moût un ensemble de substances de nature sensiblement différente et qui lui est propre. Toutes choses égales, *Penicillium frequentans* semble fournir les sécrétions les plus abondantes (tableau I) et les plus variées (9 groupes majeurs de protéines) *Mucor* donne un faible poids de substances précipitables par l'éthanol qui contiennent cependant un nombre de groupes majeurs de protéines non négligeable.

II — ACTIVITES ENZYMATIQUES RENCONTREES DANS LES PRECIPITES ALCOOLIQUES DES MOUTS DE CULTURE DES CHAMPIGNONS.

Dans les figures 1, 2 et 3, on signale les tubes où a été détecté l'activité la plus importante pour chaque enzyme.

Après la filtration sur gel, rassemblement des éluats correspondant à chaque fraction, désalination et lyophilisation, on dose les activités enzymatiques, les sucres et les protéines. On observe que les activités se trouvent localisées presque exclusivement dans la fraction b de l'éluat de *Botrytis cinerea* et de *Mucor* (Figures 1 et 2) et dans la fraction c de l'éluat de *Penicillium frequentans*. (Figure 3).

Pour faciliter les comparaisons ces activités ont été ramenées au litre de moût (tableau II).

Botrytis cinerea se caractérise par une activité glucosaminidase extrêmement forte qui paraît lui être quasi spécifique ; les deux autres champignons ne développent cette activité que très faiblement. Les activités glucosidase et galactosidase, notamment β -galactosidase, sont également relativement importantes ; les activités glucuronidase et α -mannosidase restent faibles.

Penicillium frequentans se caractérise par une activité glucuronidase élevée et des activités glucosidase et galactosidase non négligeables. *Mucor* se distingue surtout par une absence presque totale des activités enzymatiques expérimentées, si ce n'est une notable activité α -galactosidase.

Les trois champignons partagent un certain nombre de propriétés enzymatiques. Néanmoins leur localisation différente dans les éluats semble montrer qu'il s'agit de protéines de poids moléculaires différents.

TABLEAU II

Composition globale en polysaccharides et protéines des précipités alcooliques des moûts après développement des champignons.

		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Mucor</i>
Osés	mg/10 mg de précité	2,914	7,400	3,500
	mg/litre de moût	145,7	444	10,5
Protéines	mg/10 mg de précipité	0,58	0,64	0,24
	mg/litre de moût	29	38,4	0,72

III — ANALYSE DU PRECIPITE ALCOOLIQUE D'UN MOUT DE RAISIN POURRI DANS LES CONDITIONS DE LA PRATIQUE.

La répartition dans l'éluat du précipité alcoolique, des substances polysaccharidiques et protéiques est donnée figure 4. Les deux éléments sont intimement liés.

La fraction a contient seulement un groupe protéique majeur ; la fraction b en contient 2, la fraction c en contient ?.

Les sept activités enzymatiques testées existent dans le précipité. On observe une forte activité α -galactosidase, une activité glucuronidase et α -manosidase.

Ces résultats permettent de supposer le développement sur les raisins dont est issu le moût, de *Botrytis cinerea* (importantes activités glucoseaminidase et α -glucosidase) et de *Mucor* (forte activité α -galactosidase) et excluent celles de *Penicillium frequentans* (faible activité glucuronidase). On peut dès lors supposer que le vin présentera une certaine fragilité, vis-à-vis des attaques bactériennes lactiques (SAN ROMAO, 1985).

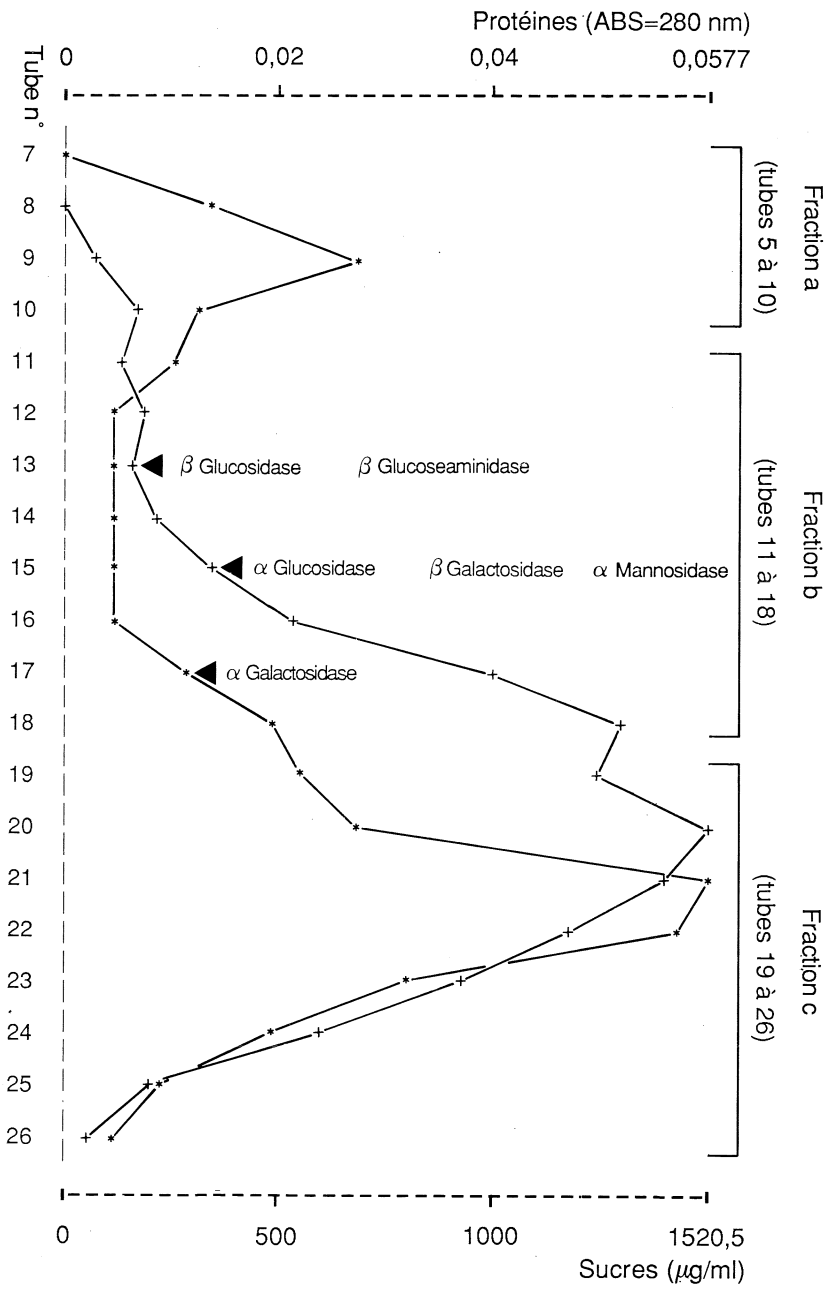


Fig. 4 — Fractionnement sur Sépharose CL-4B d'un extrait alcoolique d'un moût de raisins pourris recueillis dans les conditions de la pratique.

DISCUSSION-CONCLUSION

Les champignons filamenteux qui parasitent les raisins développent dans le moût des activités enzymatiques de type carbohydrases. Celles-ci sont imputables à des protéines ou glycoprotéines de poids moléculaires variables selon le champignon, éventuellement associées à des substances de nature osidique. Elles sont susceptibles, dans la période préfermentaire de modifier la composition du moût et, en conséquence, d'intervenir sur la fermentescibilité.

Une étude approfondie des activités des principaux champignons filamenteux rencontrés sur le raisin devrait aboutir à dégager des activités spécifiques de chacun d'eux. On connaît l'incidence des produits du métabolisme fongique à l'égard notamment de la croissance des bactéries lactiques (SAN ROMAO et LAFON-LAFOURCADE, 1979). La connaissance de ces activités dans le moût permettrait de déterminer la nature microbologique du parasite et d'évaluer par avance la fermentescibilité malolactique ultérieure des vins. Des expérimentations destinées à approfondir ces connaissances sont actuellement en cours.

Nous avons observé par ailleurs que le développement préalable de *Mucor* exerce l'inhibition la plus importante sur les populations bactériennes lactiques. Cependant, les activités enzymatiques isolées dans les extraits alcooliques des moûts de culture de ce champignon sont relativement peu nombreuses. Ceci laisse supposer que le mécanisme d'action de l'inhibition ne repose pas principalement sur ces systèmes.

Remerciements

Ce travail a été partiellement financé par la JUNTA NACIONAL DE INVESTIGACAO CIENTIFICA E TECNOLÓGICA.

Il a été réalisé avec la collaboration du laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de PORTO et en particulier avec celle du Département d'Enzymologie de l'INSTITUTO DE GENÉTICA MÉDICA à PORTO.

Nos remerciements vont à MM. les Professeurs F. CARVALHO GUERRA, J.C. DE SOUSA et J. MAGALHÃES, à Mme M.C. SÁ MIRANDA, M.R. AGUIAR et J.C. CARNEIRO, qui nous ont accueilli dans leurs laboratoires et prodigué leurs conseils. Nous remercions également M. D. DUBOURDIEU de l'Institut d'Œnologie de l'Université de Bordeaux II pour les informations qu'il nous a fournies et l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail et aussi M. B. PUCHEU-PLANTÉ du Laboratoire interrégional de la Répression des Fraudes de Talence qui nous a procuré les souches de champignons.

Manuscrit reçu le 3 février 1986 ; accepté pour publication le 20 mars 1986.

RESUME

La composition macromoléculaire des extraits alcooliques de moûts parasités par certains champignons filamenteux est variable, également certaines activités enzymatiques qui leur sont associées. Tandis que l'extrait de *Botrytis cinerea* se caractérise par une forte activité N-acétyl- β -glucoseaminidase, ceux de *Penicillium* et de *Mucor* auront respectivement une activité- β -glucuronidase et α -galactosidase importantes.

SUMMARY

Macromolecular composition of alcoholic extracts from certain filamentous fungi infected musts is variable. It is the same for certain enzymatic activities associated to them. Even the extract of *Botrytis cinerea* is characterized by a strong N-acetyl- β -glucosaminidase activity, those of *Penicillium* and *Mucor* will have respectively an activity β -glucuronidase and α -galactosidase important.

ZUSAMMENFASSUNG

Die makromolekuläre Zusammensetzung der alkoholischen Auszüge der Moste, die von bestimmten faserigen Pilzen besetzt, ist veränderlich. Genauso wie bestimmte enzymatische Vorgänge, die damit verbunden sind. Während der Auszug *Botrytis cinerea* sich durch eine starke N-acetyl- β -glucosaminidase Aktivität auszeichnet, besitzen der des Penezilins und der des Mukors beiderseitig eine wichtige β -glucuronidase und α -galactosidase Aktivität.

RESUMEN

Se encuentran diferencias de composición en las macromoléculas extraídas por el alcohol, a partir de mostes contaminados por mohos identificados. Las mismas diferencias intervienen a nivel enzimático. En casos de contaminación debida al *Botrytis cinerea*, se nota una fuerte acción N-acetilo, beta glucosaminasa. Con el *Penicillium* la acción es de tipo beta glucuronosidásico, mientras con el *Mucor* es de tipo alfa galactosidásico. Estas encimas desarrollan un papel importante.

RIASSUNTO

La composizione macromolecolare degli estratti alcolici di mosti parassitati da certi funghi filamentosi é mutevole ed anche certe attività enzimatiche che sono associate a questi funghi. Mentre l'estratto di *Botrytis Cinerea* é caratterizzato da una forte attività N-acetyl- β -glucosaminidase, gli estratti di *Penicillium* e di *Mucor* avranno rispettivamente un'attività- β -glucuronidase e α -galactonidase importanti.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAYONOVE C., GUNATA Z. et CORDONNIER, 1983. Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans le développement de l'arôme du jus de Muscat avant fermentation : la production des terpénols. XVIII^e Congrès International de l'O.I.V., Le Cap, Octobre 1983.
- CORDONNIER R. et du GAL A., 1968. Les activités protéolytiques du raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **17**, n° 3, 189-206.
- CORDONNIER R., 1970. Effets du chauffage de la vendange sur quelques constituants des moûts. *Bull. O.I.V.*, **43**, 139-145.

- CORDONNIER R. et BAYONOVE C., 1974. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par un ou plusieurs enzymes du fruit. *C.R. Acad. Sc. Paris, Série D*, n° 278, 3387-90.
- DREYFUS J.-C. et POENARU L., 1975. Le diagnostic enzymatique dans les maladies lysosomiales. *Arch. Franc. Péd.*, 32, 503-51.
- DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea* — Applications technologiques. *Thèse 3^e cycle, Université de Bordeaux II*.
- DUBOURDIEU D., 1982. Recherches sur les polysaccharides sécrétées par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. *Thèse Doctorat d'Etat, Université de Bordeaux II*.
- DUBOURDIEU D. et RIBEREAU-GAYON P., 1983. Mise en évidence d'une activité estérase chez *Botrytis cinerea*. Incidence technique. XVIII^e Congrès International de l'O.I.V., Le Cap, octobre 1983.
- FEUILLAT M. et BERGERET J., 1975. Influence des traitements thermiques de la vendange sur l'extraction des constituants azotés. *C.R. Acad. Sci.*, 264 D, 2520-2583.
- GALJARD H., 1980. Genetic metabolic diseases — Early diagnosis and prenatal analysis (p. 825), Elsevier, North-Holland.
- GLASER et SLY, 1973. *J. Lab. Clin. Med.* 82, 969-977.
- HERBERT C., PHIPPS P.D. et STRANGE R.E., 1974. Methods on Microbiology, 5 (p. 209). *Academic Press, London*.
- KOH K.H., 1985. Recherches sur l'activité estérase exocellulaire de *Botrytis cinerea* et sur l'action fongique de l'acide hexanoïque. *Thèse 3^e cycle, Université de Bordeaux II*.
- KOVAC V. et VEBASKI L.J., 1983. Quelques moisissures présentant un intérêt œnologique : *Penicillium* et *Cladosporium*. *Bull. O.I.V.*, 628, 420-432.
- MAYER A.M., 1978. Les oxydases des raisins et des vins. *Ann. Technol. Agric.*, 27, n° 1, 149-159.
- PETERS S.P., LEE R.E. et GLEW R.H., 1975. A microassay for voucher disease. *Clin. Chim. Acta*, 60, 391-396.
- POENARU L. et DREYFUS J.C., 1978. α -manosidase in human red cells. *Biochim. Biophys. Act.*, 566, 67-71.
- PUCHEU-PLANTE B. et SEGUIN G., 1978. Pourriture vulgaire et pourriture noble en Bordelais. *Connaissance Vigne Vin*, 12, n° 1, 21-34.
- RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBEREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1977. *Sciences et Techniques du Vin*, Tome 4 (p. 25), Dunod, Paris.

- ROBINSON et THORPE, 1974. Fluorescent assay of α -L-fucosidase, *Clin. Chim. Acta*, 55, 65-69.
- SAN ROMAO M.V. et LAFON-LAFOURCADE S., 1979. Premières observations sur l'action de *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin à l'égard du métabolisme des bactéries lactiques dans les moûts et les vins. *Vitis*, 18, 155-160.
- SAN ROMAO M.V., 1985. Observations sur le métabolisme des bactéries lactiques dans les moûts de raisins altérés. *Connaissance Vigne Vin*, 19, n° 1, 109-116.
- USSEGLIO-TOMASSET L., 1983. L'évolution invertasique du moût au vin. XVIII^e Congrès International de l'O.I.V., Le Cap, Octobre 1983.
- VILLETZAZ J.-C., 1983. Les enzymes de la phase préfermentaire. XVIII^e Congrès International de l'O.I.V., Le Cap, Octobre 1983.
- WUEDIG G. et SCHLOTTER A.H., 1969. Isolierung und Nachweis von SO bindenden Stoffen im wein, *Wein Wissens*, 24, 67-82.