Connaissance Vigne Vin, 1988, **22,** N° 3, 189-195.

L'HYDROLYSE DES HÉTÉROSIDES TERPÉNIQUES DU MUSCAT A PETITS GRAINS PAR LES ENZYMES PÉRIPLASMIQUES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ph. DARRIET, J.-N. BOIDRON et D. DUBOURDIEU

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

INTRODUCTION

Plusieurs études (BAYONOVE et CORDONNIER, 1971; RIBÉREAU-GAYON et *al.,* 1975; STRAUSS et *al.,* 1986), ont montré le rôle des monoterpènes dans l'arôme de certaines variétés de raisins, en particulier du Muscat. Les terpénols de ce cépage se trouvent dans la baie, pour une part sous forme libre, volatile, odorante; ils existent aussi sous forme d'hétérosides non volatils et inodores dont ils sont libérés par hydrolyse chimique ou enzymatique (CORDONNIER et BAYONOVE, 1974; WILLIAMS et *al.,* 1982). L'activité β-glucosidase du raisin peut constituer une voie de libération des terpénols volatils, mais son intervention dans le moût est limitée en raison de l'inhibition exercée par le glucose (BAYONOVE et *al.,* 1983; BIRON et *al.,* 1988; ARYAN et *al.,* 1987). Certaines β-glucosidases fongiques sont également susceptibles au laboratoire d'hydrolyser les hétérosides terpéniques mais leur utilisation pratique se heurte aussi à leur inhibition par le glucose (CORDONNIER et *al.,* 1986; GROSMANN et *al.,* 1987; ARYAN et *al.,* 1987; SHOSEYOV et *al.,* 1988). D'autre part, l'activité α-glucosidase du raisin n'a pas d'action dans l'hydrolyse des hétérosides terpéniques du Muscat (ARYAN et *al.,* 1987).

Dans un précédent travail (DUBOURDIEU et *al.,* 1988) nous avons mis en évidence le rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la libération de faibles quantités de terpénols volatils à partir d'hétérosides terpéniques de Sauvignon. La libération de terpénols s'observa en présence de précurseurs terpéniques, au cours de la fermentation alcoolique de jus de raisin, ainsi qu'en milieu modèle avec des levures non proliférantes. Ces observations suggèrent une contribution des activités enzymatiques levuriennes à l'hydrolyse des hétérosides terpéniques du raisin.

Dans le présent article, nous étudions l'activité des enzymes localisées entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique de *Saccharomyces cerevisiae* (enzymes périplasmiques) vis-à-vis des précurseurs terpéniques isolés du Muscat..

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — PRÉPARATION DES HÉTÉROSIDES TERPÉNIQUES DU MUSCAT

Les hétérosides terpéniques sont issus d'un litre de vin de liqueur de Muscat à petits grains préalablement désalcoolisé et concentré à 240 ml à l'évaporateur rotatif. L'isolement des hétérosides terpéniques est réalisé selon la méthode de GÜNATA (1984) sur colonne (10 x 1,5 cm) d'Amberlite XAD2 éluée successivement, après le dépôt de l'échantillon, par 240 ml d'eau, 240 ml d'hexane et 240 ml d'acétate d'éthyle. L'éluat à l'acétate d'éthyle contenant les hétérosides terpéniques est conservé à 4° C.

II — PRÉPARATION DES CELLULES INTACTES

Saccharomyces cerevisiae (levure sèche active, souche EG8 C) est précultivée 3 jours à 25° C sur jus de raisin (2,25 litres). La biomasse est recueillie par centrifugation (10 mn; 3.800 g). Le culot est rincé à l'eau et repris par 25 ml de tampon acétate de sodium (0,05 M; pH 5).

III — PRÉPARATION DE L'EXTRAIT PÉRIPLASMIQUE

On effectue selon la méthode de AIGLE et *al.*, (1984), une digestion enzymatique de la paroi cellulaire de la levure; l'intégrité de la membrane plasmique est préservée dans un milieu isotonique tandis que le contenu du périplasme est libéré.

Afin de fragiliser les parois des levures, une partie aliquote des cellules intactes (issues de 1,35 l de moût en fermentation) est reprise par 20 ml de tampon SCE β-mercaptoéthanol (sorbitol 1,2 M; citrate de sodium 0,1 M; éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 0,06 M : pH 7,0; et additionné de β-mercaptoéthanol à raison de 1 ml par litre. La concentration en levures de l'ordre de 1,2 10^9 cellules/ml). Après centrifugation (4° C 10 mn; 3.800 g), le culot est repris dans 20 ml de tampon SCE sans β-mercaptoéthanol et additionné de Zymolyase (20.000 U/g) à raison de 3,2 mg/ml. Les tubes sont incubés à 37° C pendant 1 h 30. La conversion en sphéroplastes est vérifiée au microscope par le test d'osmosensitivité suivant : 50 μl du milieu d'incubation sont dilués dans 2 ml d'eau (les sphéroplastes sont lysés) ou 2 ml de tampon SCE (les sphéroplastes conservent leur forme). Les sphéroplastes et résidus des parois sont séparés des constituants périplasmiques par centrifugation douce (1.500 g; 4° C; 10 mn) d'après ELANGO et *al.*, (1982).

Le surnageant, contenant les enzymes périplasmiques solubles, est dialysé contre 5 litres de tampon acétate de sodium (0,05 M; pH 5) pendant 1 h 30 à 4° C. A partir du dialysat, différents lots sont constitués.

IV — HYDROLYSE D'HÉTÉROSIDES TERPÉNIQUES PAR UN EXTRAIT PÉRIPLASMIQUE LEVURIEN

Les hétérosides terpéniques correspondant à 250 ml de vin de liqueur de Muscat (60 ml d'éluat à l'acétate d'éthyle), séchés sous vide à l'évaporateur rotatif, sont repris par 250 ml de tampon acétate de sodium. Les précurseurs sont incubés à 25° C à l'obscurité dans différentes conditions : en présence de Zymolyase (0,2 g/l), de cellules

de levures intactes (8.10^7 cellules/ml), d'un extrait périplasmique issu de levures et du même extrait périplasmique inactivé par la chaleur (110° C, 10 mn). Le témoin de l'expérience contient seulement les hétérosides terpénides dissous dans le tampon. Le pH des différents lots est ajusté à 5,0 (pH proche du pH intracellulaire de la levure), sauf dans le cas des cellules intactes (pH 3,5).

V — DOSAGE DE L'ACTIVITÉ β-GLUCOSIDASE DE L'EXTRAIT PÉRIPLASMIQUE

On utilise la méthode décrite par TINGLE et HALVORSON (1971), on opère aux mêmes concentrations d'extraits enzymatiques que dans les lots incubés avec les hétérosides terpéniques. Le volume final est ramené à 10 ml avec un tampon acétate de sodium (0,05 M ; pH 5) et additionné de 0,3 ml de paranitrophényl-β glucopyranoside (β-pNPG) 10^{-2} M ; les tubes sont placés 24 heures à 25° C. La réaction est arrêtée par 1 ml de carbonate de sodium 1 M. La densité optique du surnageant est mesuré à 400 nm après centrifugation. On déduit la quantité de paranitrophénol libéré ; une unité d'activité β-glucosidase est définie par la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une nanomole de paranitrophénol dans les conditions précédemment décrites.

VI — DOSAGE DES TERPÉNOLS VOLATILS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

100 ml d'échantillon, centrifugés (15 mn à 3.000 tr/mn) et neutralisés à pH 7 par de la soude, sont additionnés de 1 ml d'étalon interne (octanol 2 à 10 mg par litre) et extraits successivement par 2 ml, 1 ml et 1 ml d'un mélange d'éther diéthylique-hexane (1-1, v/v). Pour chaque extraction, on réalise une émulsion par agitation magnétique pendant 5 minutes. Les trois phases organiques, séparées dans une ampoule à décanter, sont regroupées dans un pilulier. Seule la phase supérieure limpide du mélange est recueillie et concentrée par balayage à l'azote (1 ml par seconde) à environ 500 μl.

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes : chromatographe Carlo Erba 4160 ; colonne capillaire CP WAX 52 CB (50 m x 0,35 mm) ; injection «on column» de 1 microlitre ; température de la colonne 45° C pendant une minute, puis augmentation de 3° C par minute jusqu'à 240° C, enfin isotherme de 15 minutes ; température du détecteur à ionisation de flamme, 250° C.

RÉSULTATS

Cette technique permet un dosage sensible (environ 1 μg/l) des principaux terpénols. La reproductibilité est de 3 à 15 p. 100 en fonction des terpénols.

I — HYDROLYSE DES PRÉCURSEURS TERPÉNIQUES DU MUSCAT PAR L'EXTRAIT PÉRIPLASMIQUE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Le tableau I montre que l'incubation des hétérosides terpéniques avec des cellules intactes de *Saccharomyces cerevisiae* (8.10^7 cellules/ml) libère en 72 heures, de 50 à 100 μg par litre de terpénols volatils. En présence de l'extrait périplasmique issu d'une quantité équivalente de levures, l'hydrolyse des hétérosides terpéniques libère plus de 500 μg par litre de terpénols volatils. L'hydrolyse chimique des précurseurs

TABLEAU I

Libération de terpénols à partir d'hétérosides terpéniques dans un milieu tamponné (72 heures d'incubation à l'obscurité à 25 °C).

Les chiffres représentent des µg/l.

	Témoin pH 5,0	+ Zymolyase (0,2 g/l) pH 5,0	+ cellules intactes de levures pH 3,5	+ extrait périplasmique de levures	
				actif pH 5,0	inactivé pH 5,0
Linalol	3	3	2	5	2
α - terpinéol	2	2	3	11	2
Citronellol	6	8	9	39	6
Nérol	0	0	38	208	0
Géraniol	0	0	27	286	0
Terpénols totaux	11	13	79	549	10

TABLEAU II

Incidence du glucose sur la libération des terpénols volatils par un extrait périplasmique levurien et sur l'activité β - glucosidase (48 heures d'incubation à l'obscurité à 25 °C).

Les teneurs en terpénols sont exprimées en µg/l.

	Témoin hétérosides terpéniques dans tampon acétate de sodium 0,05 M, pH 5,0	Extrait périplasmique en présence des hétérosides terpéniques	
		sans glucose	avec glucose
Linalol	0	0	0
α-terpinéol	0	5	4
Citronellol	4	18	11
Nérol	2	98	82
Géraniol	4	84	75
Terpénols totaux	10	204	172
Activité β-glucosidase U/ml	0	480	500

dans le tampon ou en présence de l'extrait périplasmique inactivé par la chaleur est négligeable.

L'incubation en présence de Zymolyase montre que cette préparation ne peut pas être responsable des libérations de terpénols observées avec l'extrait périplasmique; en outre la Zymolyase est dépourvue d'activité β-glucosidase dosée avec le β-pNPG.

II — INCIDENCE DU GLUCOSE SUR L'ACTIVITÉ DE L'EXTRAIT PÉRIPLASMIQUE DES LEVURES A L'ÉGARD DES PRÉCURSEURS TERPÉNIQUES ET DU β-pNPG.

Dans une autre expérience, l'hydrolyse des hétérosides terpéniques par l'extrait périplasmique correspondant à 2.10^8 cellules/ml est réalisée pendant 48 heures en l'absence de glucose ou en présence de 50 g de glucose par litre. Le tableau II montre l'absence d'inhibition exercée par le glucose sur l'activité β-glucosidase de l'extrait périplasmique, en utilisant comme substrat le β-pNPG; de même, les quantités des terpénols volatils, libérés à partir des hétérosides terpéniques, sont voisines.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats précédents montrent clairement que *Saccharomyces cerevisiae* possède, dans son espace périplasmique, c'est-à-dire entre membrane et paroi une ou plusieurs activités enzymatiques, dont la β-glucosidase, capables d'hydrolyser des hétérosides terpéniques du Muscat en libérant des terpénols volatils odorants (en particulier nérol et géraniol). Les quantités libérées dans nos conditions expérimentales sont supérieures au seuil de perception olfactive (supérieures à 50 µgl).

Il est remarquable de constater que la β-glucosidase périplasmique de la levure, même extraite des structures cellulaires est peu sensible à l'effet inhibiteur du glucose. Les β-glucosidases fongiques sont habituellement inhibées à plus de 90 p. 100 par des teneurs en glucose supérieures à 18 g/l (ARYAN et *al.*, 1987).

Ces observations suggèrent que certaines activités enzymatiques du périplasme de la levure puissent agir sur les précurseurs de l'arôme variétal des vins. Les travaux en cours se proposent de purifier la β-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* et d'étudier ses propriétés biochimiques et les possibilités d'application œnologiques.

Manuscrit reçu le 4 juillet 1988; accepté pour publication le 2 septembre 1988.

RÉSUMÉ

L'espace périplasmique de la levure contient certaines osidases capables d'hydrolyser les hétérosides terpéniques du Muscat à petits grains, en libérant des terpénols volatils odorants, en particulier du nérol et du géraniol. L'activité β-glucosidase joue certainement un rôle important dans ces réactions. Alors que l'inhibition par le glucose est de règle avec les β-glucosidases exocellulaires fongiques, l'activité hydrolytique d'un extrait périplasmique de levure à l'égard du β-pNPG ou d'hétérosides terpéniques de Muscat est peu affectée par la teneur en glucose du milieu réactionnel. Ces observations suggèrent que certaines enzymes périplasmiques de la levure puissent agir sur les précurseurs de l'arôme variétal des vins.

SUMMARY

Osidases located in periplasmic space of *Saccharomyces cerevisiae* are able to hydrolyse monoterpenes heterosides of Muscat grapes. To prepare the periplasmic extract, yeast cell walls are digested with *Zymolyase* in the presence of an osmotic protector to prevent lysis of the resulting protoplasts; periplasmic enzymes are liberated into the supernatant medium. Monoterpenes heterosides are incubated 48 or 72 hours at 25° C with either intact yeast cells or periplasmic enzymatic extract. Monoterpenes, especially gerianol and nerol, are liberated in these conditions. β-glucosidase activity seems to play an important role in these reactions.

Fungal extracellular β-glucosidases are commonly strongly inhibited by glucose. Surprisingly, the activity of periplasmic yeast β-glucosidase is quite glucose independant. These results suggest that some periplasmic enzymes from yeast may be involved in the hydrolysis of varietal aroma precursors in wines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIGLE M., ERBS D. et MOLL M., 1984. Some Molecular Structures in the Genome of Lager Brewing Yeasts. ASBC Journal, 42, N° 1, 1-7.

ARYAN A.P., WILSON B., STRAUSS C.R. et WILLIAMS P.J., 1988. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their β-glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An accessment of possible applications in enology. *Ann. J. Enol. Vitic.*, **38,** N° 3, 182-188.

BAYONOVE C. et CORDONNIER R., 1971. Recherches sur l'arôme du Muscat. Étude de la fraction terpénique. *Ann. Technol. Agric.*, **20,** N° 4, 347-355.

BAYONOVE C. GÜNATA Z. et CORDONNIER R., 1983. Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans le développement de l'arôme du jus de Muscat avant fermentation alcoolique. XVIII[e] Congrès International de la Vigne et du Vin de l'O.I.V. Le Cap, 93-111.

BIRON C., CORDONNIER R., GLORY O., GÜNATA Z. et SAPIS J.C., 1988. Étude dans le raisin de l'activité β-glucosidase. *Connaissance Vigne Vin,* **22,** N° 2, 125-134.

CORDONNIER R. et BAYONOVE C., 1974. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. C.R. Acad. Sc. Paris, série D, N° 278,3387-3390.

CORDONNIER R. et BAYONOVE C. et BAUMES R., 1986. Données récentes sur les précurseurs d'arômes du raisin, perspectives de leur exploitation en vinification. *Rev. Fr. Oenologie,* N° 102, 29-41.

DUBOURDIEU D. DARRIET Ph., OLLIVIER C., BOIDRON J.N. et RIBÉREAU-GAYON P., 1988. Rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans l'hydrolyse des hétérosides terpéniques du jus de raisin. C.R. Acad. Sc. Paris, série III, 306, 489-493.

ELANGO N., CORREA Julieta et CABIB E., 1982. Secretory character of yeast chitinase. *J. Biol. Chem.,* 257, 1398-1400.

GÜNATA Y.Z., 1984. Recherches sur la fraction liée de nature glucosidique de l'arôme de raisin = Importance des Terpényl-glycosides- Action des glycosidases. *Thèse de Docteur-Ingénieur,* Université de Montpellier.

GROSMANN M., RAPP A. et RIETH W., 1987. Enzymatische Freisetzung gebundener Aromastoffe in Wein. *Dtsch. Lebensm.-Rdsch.* 83, N° 1, 7-12.

RIBÉREAU-GAYON P., BOIDRON J.N. et TERRIER A., 1975. Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem.,* 23, N° 6, 1042-1047.

SHOSEYON O., BRAVDO B.A., IKAN R., CHET I., 1988. Endo-β-glucosidase from *Aspergillus niger* grown on a monoterpene glucoside-containing medium. *Phytochemistry,* **27,** N° 7, 1973-1976.

STRAUSS C.R., WILSON B., GOOLEY P.R. et WILLIAMS P.J., 1986. Role of monoterpenes in grape and wine flavor. *American Chemical Society,* 18, 222-242.

TINGLE M.A. et HALVORSON H.O., 1971. A comparison of β-glucanase and β-glucosidase in *Saccharomyces lactis.* Biochim. Biophys. Acta, 250, 165-171.

WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B. et MASSY-WESTROPP R., 1982. Novel monoterpenes dissacharide glycoside of *Vitis vinifera* grapes and wines. Phytochemistry, 27, n° 7, 1973-1976, 21, n° 8, 2013-2020.