Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1996, **30**, N°2, 103-111

COMPARAISON DES ACTIVITÉS PECTOLYTIQUES ET PROTÉOLYTIQUES DE SIX PRÉPARATIONS COMMERCIALES CLARIFIANTES. INCIDENCE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES SECONDAIRES SUR LES PROTÉINES DE MOÛTS CHAMPENOIS

COMPARISON OF PECTOLYTIC AND PROTEOLYTIC ACTIVITIES OF SIX CLARIFYING COMMERCIAL PREPARATIONS. INCIDENCE OF SECONDARY ENZYMATIC ACTIVITIES ON PROTEINS IN CHAMPAGNE MUSTS

L. BERTHIER, R. MARCHAL et A. MAUJEAN

UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Laboratoire d'Œnologie,
Moulin de la Housse, B.P. 1039, 51687 Reims cedex 2 (France)

Résumé : Afin d'évaluer l'aptitude clarifiante ainsi que les incidences d'un traitement préfermentaire des moûts par les pectinases commerciales, les activités polygalacturonase (PG), pectine lyase (PL), pectine méthyl estérase (PME) et protéase de six préparations de pectinases, sont étudiées. l'activité PG est majoritaire et proportionnelle à la concentration protéique des pectinases. L'analyse par SDS-PAGE et IEF des protéines présentes dans les préparations révèle des poids moléculaires compris entre 20 et 100 kDa et des points isoélectriques compris entre 3,00 et 7,40. La présence de protéases est montrée dans les six échantillons analysés en utilisant la fluorescamine-caséine comme substrat. Cette activité varie dans un rapport de 1 à 11 dans les pectinases commerciales mais ne semble pas avoir d'incidence sur les protéines des moûts en raison de leurs caractéristiques biochimiques intrinsèques ou des conditions du milieu (pH, température). Les protéines totales de deux moûts de cépage champenois - Chardonnay (CH) et Pinot noir (PN) - sont séparées par IEF dans une gamme de points isoélectriques compris entre 3,30 et 4,55 (CH) et entre 3,30 et 4,90 (PN).

Abstract : In order to estimate clarifying aptitude and the effects of prefermentation treatment by commercial pectinases, polygalacturonase (PG), pectin lyase (PL), pectinmethylesterase (PME) and proteolytic activities of six pectinases samples were studied. PG activity is preponderate and proportional to the relative protein concentration. These one, submitted to both SDS-PAGE and isoelectric focusing technics, show molecular weights ranging from 20 to 100 kDa and isoelectric points ranging from 3.00 to 7.40. Total protein of Champagne grape varieties - Chardonnay (CH) and Pinot noir (PN) - were submitted to an isoelectric focusing. All of the pI's ranging from 3.30 to 4.55 (CH) and from 3.30 to 4.90 (PN). Proteases are put in evidence in commercial pectinases using fluorescamine-casein as substrate. However, they seem to have no incidence upon must proteins.

Mots-clefs : moût, pectinases, protéases, protéines

Key words : must, pectinases, proteases, proteins

INTRODUCTION

Un débourbage avec floculation et séparation rigoureuse des bourbes limite les dérives organoleptiques (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975), en particulier celles dues aux activités lipoxygénases (CROUZET, 1986). Cependant, le débourbage naturel des moûts avec floculation et sédimentation des bourbes reste souvent une opération mal maîtrisée, en qualité comme en durée, et dépend de nombreux paramètres : teneurs initiales des jus en pectines et protéines (au demeurant très variables d'un millésime à l'autre), température des jus, importance de l'altération due à la pourriture grise, volume et géométrie des cuves utilisées. De plus, la phase enzymatique précédant la clarification naturelle d'un jus de fruit est essentielle et éventuellement limitante (insuffisance de la teneur naturelle en pectinases) pour la phase de tassement des floculats et des bourbes fines. Aussi, l'utilisation de préparations pectolytiques du commerce, renfermant les activités polygalacturonase (PG - EC 3.2.1.15), pectineméthylestérase (PME - EC 3.1.1.11) et pectinelyase (PL - EC 4.2.2.10), permet l'obtention plus rapide et plus efficace de moûts

limpides (turbidité inférieure à 30 NTU). Les floculats formés sont de 15 à 20 fois plus compacts que ceux d'un moût témoin (KARMONA et *al.*, 1990) et la viscosité des moûts réduite de 25 p. cent (SREENATH et SANTHANAM, 1992). La limpidité obtenue joue un rôle important sur la fermentescibilité et le terme de la fermentation alcoolique (OLLIVIER et *al.*, 1987) et la filtrabilité du vin est améliorée (VILLETAZ, 1990). Les pectinases produites industriellement sont le plus souvent extraites de biomasses d'*Aspergillus niger* sans purification préalable (CARPENTIER, 1986), incorporées à un excipient et commercialisées à l'état de poudre. Cependant, le Codex œnologique international n'impose pas de mentionner sur l'emballage les activités enzymatiques avec une unité normalisée. Le mode de fermentation (milieu liquide ou solide, nature du substrat) n'est pas précisé. Or, selon ces conditions, certaines autres enzymes peuvent être sécrétées, par exemple des oxydases, une cinnamyl estérase pouvant conduire à des déviations organoleptiques (CHATONNET et *al.*, 1992 ; DUGELAY et *al.*, 1993) ainsi que des protéases (FROST et MOSS, 1987). De ce fait, il est actuellement impossible de comparer les préparations entre elles.

Dans le cadre d'une étude comparative de six préparations commerciales, nous nous proposons donc de quantifier les activités pectolytiques mais également protéolytiques, en nous intéressant à l'incidence de ces dernières sur les caractéristiques protéiques des moûts traités. En effet, l'existence de protéases pourrait se révéler néfaste vis-à-vis des propriétés moussantes des vins mousseux de Champagne, largement liées aux protéines (BRISSONNET et MAUJEAN, 1991, 1993).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — MATÉRIEL D'ÉTUDE

Les six pectinases commerciales étudiées sont notées E1, E2, E3, E4, E5, E6. Elles se présentent sous forme de poudre, de granulométrie et de couleur variées. Elles sont stockées à + 4°C.

Les moûts utilisés sont issus de Pinot noir (PN) et Chardonnay (CH) de la vendange 1993. Ils sont sulfités à 5 g/hl à la sortie du pressoir pneumatique. Leur pH est égal à 3,0. Deux doses de pectinases sont testées : 1 mg/l (CH) et 2 mg/l (PN) sur des volumes de cuves de 120 hl pour (CH) et de 40 hl (PN). Après 20 heures de débourbage, les môuts sont prélevés, centrifugés (30 min à 2000 g), puis filtrés sur membrane en acétate de cellulose de porosité 0,45 µm (SARTORIUS). Les moûts filtrés sont alors concentrés puis dialysés contre de l'eau distillée par ultrafiltration tangentielle (+ 4°C sous azote) au moyen d'une membrane en polysulfone hydrophile (SGI 30 UFIB) coupant à 10 kDa. Les rétentats dialysés sont enfin lyophilisés (SERAIL CS 5L) et conservés à - 20 °C.

II — PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS PROTÉIQUES

Les poudres de pectinases solubilisées dans l'eau distillée à 100 g/l sont concentrées (de 15 ml à 2 ml) puis dialysées contre de l'eau distillée par ultrafiltraton frontale (Centriprep®,AMICON) coupant à 10 kDa. Les concentrats sont aliquotés et congelés à -20°C.

Les macromolécules de moûts lyophilisées sont solubilisées dans de l'eau distillée et les solutions sont dialysées contre de l'eau distillée par ultrafiltration frontale (Centriprep®,AMICON) coupant à 10 kDa avant séparation des protéines par isoélectrofocalisation.

III — ÉLECTROPHORÈSES

1) SDS-PAGE

La composition protéique des six préparations enzymatiques est étudiée par SDS-PAGE (15 p. cent T, 2,7 p. cent C) (LAEMMLI, 1970). L'appareil utilisé est le Mini-Protean® Biorad. La calibration est réalisée avec des marqueurs de taille 14-94 kDa (Pharmacia). Les protéines (moûts, pectinases et marqueurs) sont traitées selon LAEMMLI (1970). La migration dure 55 min à 150 V et à température ambiante. Les gels d'épaisseur 0,75 mm sont colorés 1 h dans une solution à 0,125 p. cent p/v de bleu brillant de Coomassie R 250 (RAL Réactifs), puis décolorés dans une solution composée d'acide acétique, méthanol, eau (1:2:7) jusqu'à élimination complète du bruit de fond. Les gels sont alors séchés à l'aide du Gel Dryer® Biorad durant 45 min à 80°C.

2) IEF

Les gels de polyacrylamide ultra-minces (5 p. cent T, 3 p. cent C, urée 8M, 250 x 105 x 0,25 mm) sont préparés par nos soins. Pour l'étude des préparations clarifiantes, le gradient de pH 3-10 est obtenu par mélange de trois ampholytes (Biolytes® - Biorad) 3-10, 4-6, 5-8 dans les proportions 2:1:1 (v/v/v). Pour l'étude des protéines de moûts, le gradient de pH 2,5-5 est établi avec 800 µl de Pharmalytes® 2,5-5,0 (Pharmacia). Les mèches électrodes (LKB) sont imbibées respectivement d'acide orthophosphorique 100 mM (gradient de pH 3-10) ou d'acide sulfurique 100 mM (gradient de pH 2,5-5,0) pour l'anode et de soude (Prolabo) 100 mM pour la cathode. La migration est réalisée avec le Multiphor II 2117 LKB associé au générateur de courant 2197 LKB. Les standards de pI (2,5-6,5 ou 3-10)

sont obtenus chez Pharmacia. Les échantillons sont dilués (v/v) dans une solution d'urée 8M (Fluka), 1,4 dithiothréitol 0,2 p. cent p/v (Fluka). La migration s'effectue à + 4°C sous 2500 V, 15 mA, 2,5 W durant 2 h 30. Les gels sont colorés par mélange v/v des solutions 1 (10 g de sulfate de cuivre + 200 ml d'acide acétique, d'eau distillée qsp 1000 ml) et 2 (3 g de bleu de Coomassie R250 (RAL réactifs) + 900 ml de méthanol + 100 ml d'eau distillée) puis décolorés dans une solution composée de sulfate de cuivre (Fluka) à 0,5 p. cent p/v dans un mélange d'acide acétique, méthanol, eau dans les proportions 1:2,5:6,5 (v/v/v).

IV — DÉTERMINATION DE LA TENEUR PROTÉIQUE

La teneur en protéines est déterminée selon BRADFORD (1976). Elle est exprimée en g de protéines éq. BSA pour 100 g de poudre de pectinases.

V — DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

La pectine de pomme (Fluka) est utilisée car son degré de méthoxylation (70 à 75 p. cent) est assez proche de celui du raisin (65 p. cent) (DUCROO, 1990).

1) Activité polygalacturonase (PG)

L'activité PG est déterminée selon la méthode de MILNER et AVIGAD (1967), en utilisant comme substrat une solution de pectine de pomme (Fluka) à 0,2 p. cent p/v dans du tampon citrate (Prolabo) 100 mM pH = 4. 100 µl d'une solution de pectinases à 1 g/l sont introduits dans 3,9 ml de la solution de substrat. L'activité spécifique, mesurée à 40°C, est exprimée en micromoles d'acide galacturonique formé par minute et par microgramme de protéine (µmol gal UA/min/µg protéine).

2) Activité pectine lyase (PL)

L'activité PL est déterminée selon la méthode d'ISHII et YOKOTSUKA (1972). Le substrat est une solution de pectine de pomme (Fluka) à 0,2 p. cent p/v dans du tampon acéto-acétate (Prolabo) 100 mM, pH = 5,5. 100 µl d'une solution de pectinases commerciales à 1 g/l sont introduits dans 3,9 ml de la solution de pectine. L'activité spécifique, mesurée à 40°C, est exprimée en micromoles de l'ester méthylique d'acide galacturonique α, β insaturé (ε = 5500 l. $mol^{-1}.cm^{-1}$) formé par minute et par microgramme de protéine (µmol gal UA α, β/min/µg protéine).

3) Activité pectineméthylestérase (PME)

L'activité PME est déterminée selon la méthode de BARON et *al.* (1991). Le substrat est constitué par de la pectine de pomme (Fluka) à 0,2 p. cent p/v dans une solution de NaCl 100 mM ajustée à pH = 8 par une solution de soude 100 mM (Prolabo). 100 µl d'une solution de pectinases commerciales à 1 g/l sont introduits dans 30 ml de la solution de pectine de pomme. L'activité spécifique, mesurée à 30°C, est exprimée en micromoles d'acide formé par minute et par microgramme de protéine (µmol H^+/min/µg protéine).

4) Activité protéolytique

Les activités protéolytiques sont déterminées par fluorimétrie ($\lambda_{excitation}$ = 405 nm et $\lambda_{émission}$ = 473 nm). L'appareil utilisé est un spectrofluorimètre Kontron SFM 23/B. Le substrat est de la fluorescamine-caséine (Fsc-Cn) (UDENFRIEND et *al.*, 1972) préparée selon la méthode de TWINING (1984) à la concentration de 4 g/l dans du tampon phosphate 50 mM, pH = 7,8. Le milieu réactionnel se compose de 200 µl d'une solution de pectinase à 1 g/l + 200 µl de Fsc-Cn à 4 g/l + 100 µl de tampon phosphate pH = 7,8. L'activité protéolytique est exprimée en pourcentage du substrat dégradé lors de la réaction de protéolyse effectuée à 40°C.

VI — DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

La composition en acides aminés des protéines totales de moûts est déterminée avant et après enzymage. L'analyse est effectuée, après hydrolyse acide, par dérivation avec du phényl-isothiocyanate (PITC) des acides aminés libres au moyen d'une station Pico-Tag WATERS. La séparation des dérivés d'acides aminés est réalisée par HPLC (pompe Spectra Physics 8100, détecteur UV Knauer réglé à 269 nm, intégrateur Spectra Physics 4290, colonne Pico-Tag Waters 3,9 x150 mm). La préparation des solutions ainsi que les conditions d'élution sont celles de MARCHAL (1995). L'éluant A se compose de 19 g d'acétate de sodium trihydraté + 1 litre d'eau + 640 µl de triéthylamine. A 940 ml de cette solution ajustée à pH = 6,4 par de l'acide acétique glacial et filtrée, on ajoute 60 ml d'acétonitrile. L'éluant B est une solution dégazée d'acétonitrile à 60 p. cent. Les conditions d'élution sont indiquées dans le tableau I. Pour les échantillons de PN, la concentration de chaque acide aminé est déterminée en utilisant la norleucine comme standard interne. Pour les échantillons de CH, la concentration de chaque acide aminé est calculée par rapport au standard H (PIERCE) du fait de l'existence d'une molécule inconnue ayant le même temps de rétention que la norleucine. Dans les deux cas, l'incertitude est égale à l'erreur maximale commise lors du calibrage, soit 5,54 p. cent (n = 5). Le nombre de résidus amino-acide (tableau III) est égal à la moyenne des valeurs obtenues lors de deux injections du même échantillon.

TABLEAU I

Conditions d'élution des acides aminés

Temps (min)	% éluant A	% éluant B
0	100	0
8	60	40
17	0	100
19	0	100
20	100	0
38	100	0

RÉSULTATS - DISCUSSION

I — TENEURS PROTÉIQUES

Les teneurs protéiques des pectinases commerciales (tableau II) varient globalement dans un rapport de 1 (échantillon E1) à 3 (échantillon E2). Dans tous les cas, l'excipient représente, plus de 99 p. cent (p/p) des poudres commerciales, probablement pour des commodités d'utilisation.

TABLEAU II

Teneur protéique relative des échantillons de pectinases commerciales

Echantillons	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Teneur protéique (% p/p)	0,19	0,66	0,36	0,39	0,27	0,58

Les résultats sont exprimés en gramme de protéine équivalent BSA pour 100 grammes de poudre

II — ÉLECTROPHORÈSES DES PECTINASES COMMERCIALES

Les deux techniques électrophorétiques utilisées PAGE-SDS (figure 1) et IEF (figure 2) mettent en évidence la complexité protéique des échantillons. Le mode de préparation industrielle de ces enzymes permettait de prévoir ce résultat, d'autant plus que l'utilisation de pectinases purifiées n'est pas autorisée en technologie « raisin ».

III — SDS-PAGE

La majeure partie des protéines ont un poids moléculaire compris entre 20 et 100 kDa. La figure 1 révèle des différences marquées entre les échantillons. Des bandes nettes se situent à environ 94 kDa (échantillons

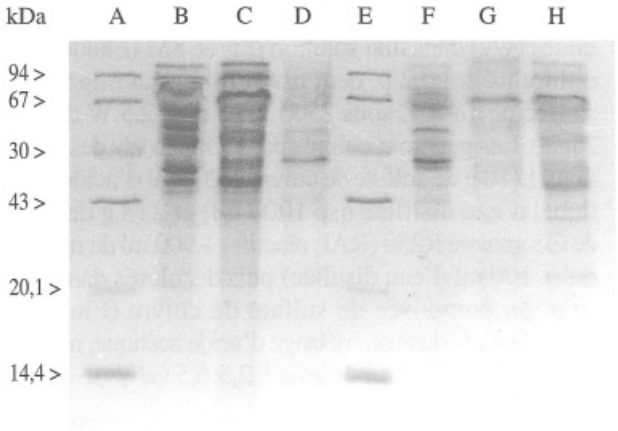


Fig. 1 — SDS - PAGE des protéines des pectinases commerciales : échantillons E1, E2, E3 (pistes B. C, C) échantillons E4, E5, E6 (pistes F, G, H). Pistes A et E : marqueurs de poids moléculaires E1 et E2) à 67 kDa (échantillons E2, E4, E5 et E6) et

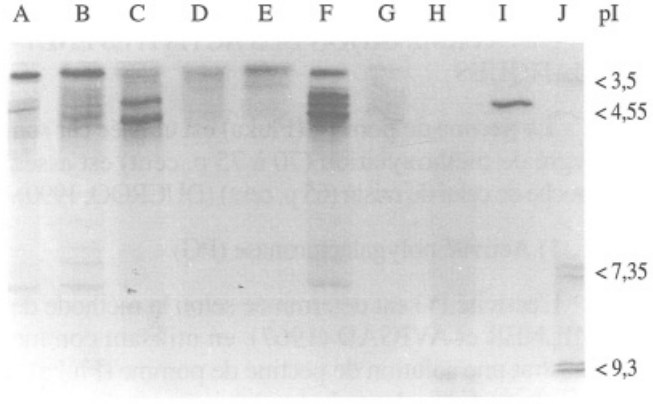


Fig. 2 — Isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide-urée des protéines des pectinases commerciales : échantillons E1 à E6 (pistes A à F), enzymes pures PG, PME et PL (pistes G, H, I), marqueurs de points iosélectriques : piste J

43 kDa (échantillon E3). Ces différences de composition sont probablement à mettre en relation avec les conditions fermentaires d'obtention des enzymes.

IV — IEF

La figure 2 représente la focalisation isoélectrique des 6 pectinases commerciales et des 3 enzymes commerciales servant de référence (SIGMA).

1) Enzymes commerciales

Pour la PG (EC 3.2.1.15), les pI des bandes les plus intenses sont compris respectivement entre 3,0 et 7,4. Au moins six bandes peuvent être visualisées pour la PG. Il pourrait s'agir des isoformes de cette enzyme. En effet, KESTER et VISSER (1990) montrent chez *Aspergillus niger* l'existence de 6 isoenzymes de la

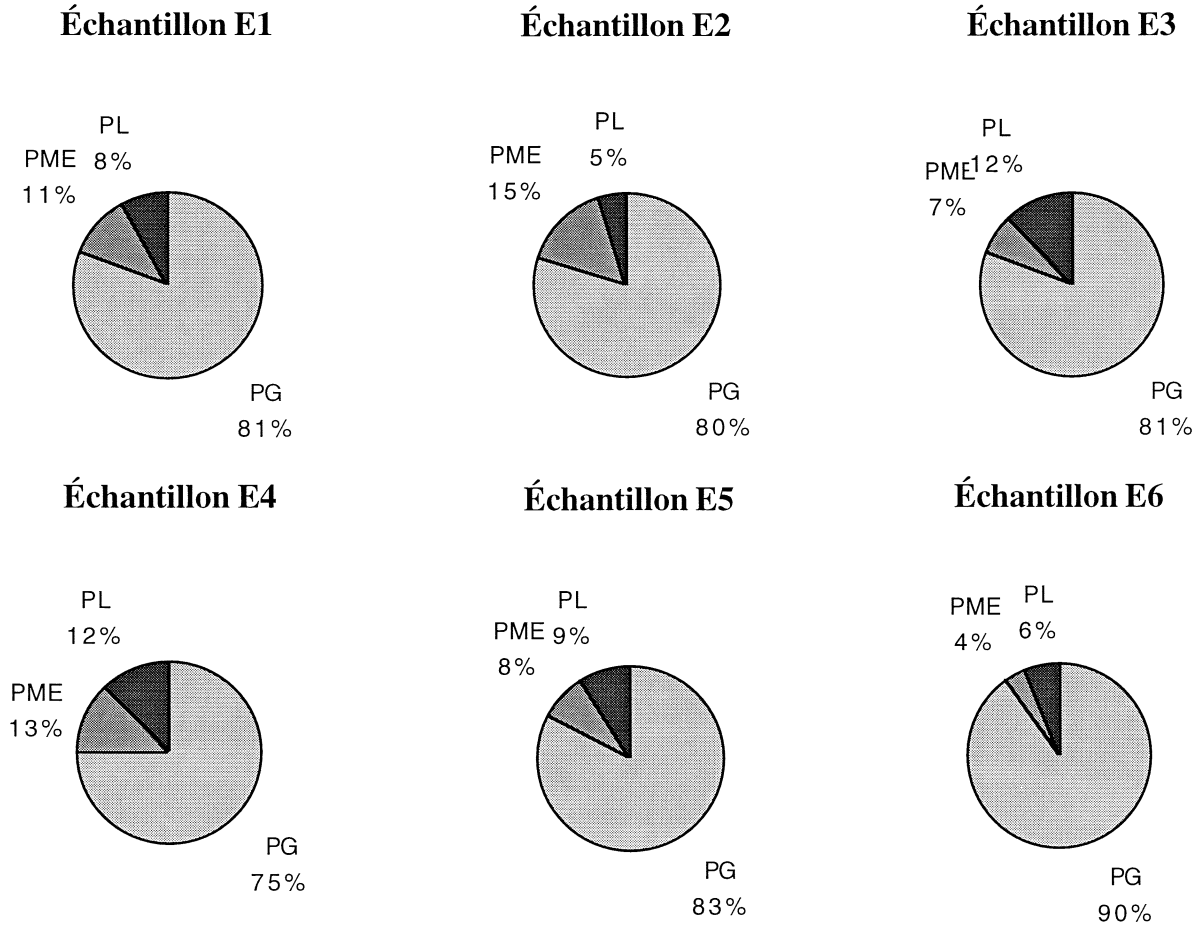


Figure 3 — Activités pectolytiques des pectinases commerciales

5 d'entre-elles présentant des points isoélectriques compris entre 3,2 et 5,9. La PL (EC 4.2.2.10) présente une bande très intense à un pI égal à 4,1 et 3 protéines mineures entre pH = 3 et pH = 4,1. Enfin, la PME, contrairement aux deux enzymes précédentes, présente plusieurs bandes focalisées à des pI compris entre 4,5 et 10,0 avec deux bandes majeures entre 9,3 et 10,0. Il est probable que la valeur de 10,0 est sous-estimée, comme le signalent RILLO et *al.* (1992), puisque la protéine se focalise à la limite supérieure du gradient de pH. BARON et *al.* (1991) signalent l'existence de deux PME focalisables en une seule bande de pI supérieur à 9,3.

2) Préparations pectolytiques

Elles ont pour caractéristiques communes d'avoir des pI acides. Les bandes les plus intenses sont focalisées à des pI compris entre 3,0 et 3,9. Des bandes mineures apparaissent à des pI compris entre 6,2 et 7,3. Ces résultats montrent que les pectinases sont quantitativement peu représentées par rapport à l'ensemble des protéines présentes dans ces préparations.

V — QUANTIFICATION DES ACTIVITÉS DE TYPE PECTINASES

L'activité spécifique PG est assez uniforme et comprise entre 75 et 90 p. cent de la somme des trois activités spécifiques des pectinases dosées (figure 3). Au contraire, la répartition des activités PME et PL est hétérogène d'un échantillon à l'autre. Celles-ci peuvent varier respectivement dans un rapport de 1 à 2 (échantillons E2 et E3) et de 1 à 3 (échantillons E2 et E4). Ces résultats montrent que les conditions fermentaires peuvent, pour un même organisme, agir sur la production d'enzymes (ZETELAKI-HORVATH, 1981, 1983 ; BAILEY et PESSA, 1990). En outre, l'activité PG est proportionnelle au taux de protéines des pectinases commerciales (figure 4) alors qu'il n'existe pas de telle relation pour les activités PME et PL.

VI — ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

Tous les échantillons analysés présentent ce type d'activité sur la fluorescamine-caséine (figure 5). Celle-

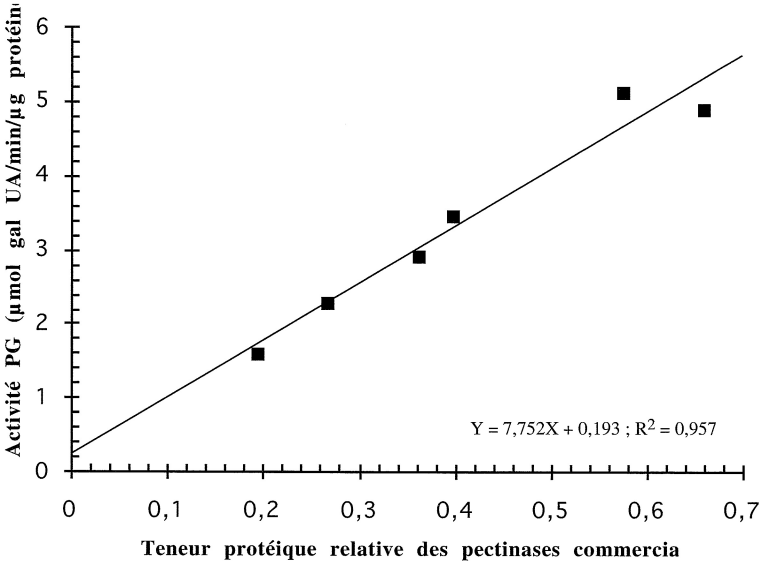


Figure 4 — Relation entre l'activité PG des pectinases commerciales et leur teneur protéique relative

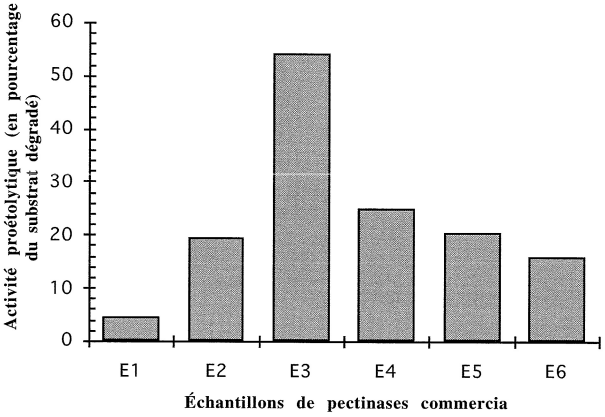


Figure 5 — Activité protéolytique des pectinases commerciales
L'activité protéolytique est exprimée en pourcentage de la quantité totale du substrat dégradé (Fsc-Cn) lors de la réaction de protéolyse.

ci peut varier dans un rapport de 1 (échantillon E1) à 11 (échantillon E3). Il faut toutefois préciser que les conditions opératoires (pH, température, nature du substrat) permettant de quantifier l'activité protéolytique sont très différentes des conditions réelles d'utilisation des préparations commerciales, moins favorables.

VII — INFLUENCE DE L'ADDITION DE PRÉPARATIONS COMMERCIALES DE PECTINASES SUR LES CARACTÉRISTIQUES PROTÉIQUES DES MOÛTS

Pour observer une éventuelle activité protéolytique des préparations clarifiantes dans les moûts, une IEF dénaturante en gradient de pH 2,5 - 5,0 est effectuée sur les protéines de moûts (PN et CH) avant et après enzymage (figure 6). La composition en acides ami-

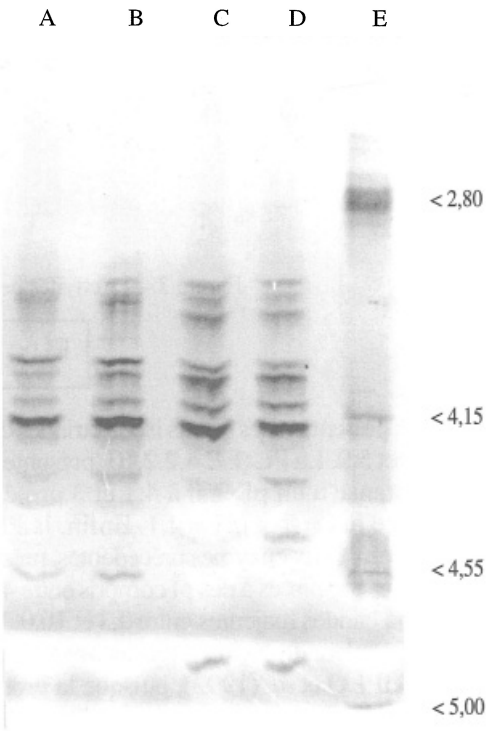


Figure 6 — Isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide-urée des protéines totales de moûts : moût CH témoin (piste A), moût Ch enzymé (piste B), moût PN témoin (piste C), moût PN enzymé (piste D), marqueurs de points isoélectriques (piste E)

nés des protéines est également déterminée. Les protéines totales des moûts ont des points isoélectriques s'établissant entre 3,30 et 4,55 (CH) et entre 3,3 et 4,9 (PN). Ces valeurs sont comparables à celles mentionnées par SANTORO (1995) pour les mêmes cépages. Toutefois, aucune protéine mineure n'est détectée au-

delà de la valeur 4,9. La présence et l'absence de 3 protéines de point isoélectrique respectivement égaux à 4,30, 4,55 et 4,90 permettent de différencier le moût de cépage PN du moût de cépage CH. De plus, il semble que les protéases contenues dans les pectinases commerciales n'ont pas affecté les protéines des moûts de manière tangible. En effet, les profils électrophorétiques obtenus sont identiques pour un même cépage. WATERS et *al.* (1992) traitent les protéines d'un vin de muscat d'Alexandrie avec un mélange de peptidases commerciales (Vinozym P, Novo) et n'observent, par SDS-PAGE, aucune dégradation après 14 jours d'incubation, alors que la BSA est totalement dégradée en 4 h seulement. Ces auteurs démontrent également qu'il s'agit d'une caractéristique intrinsèque des protéines du vin et que les polysaccharides et les polyphénols ne jouent pas de rôle colloïdes protecteurs vis-à-vis de la BSA. Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de WATERS et *al.* (1992) et semblent nettement indiquer que les protéases ne s'expriment pas de manière suffisamment prononcée pour modifier les caractéristiques protéiques des moûts ou des vins. Cependant, MODRA et WILLIAMS (1988) en incubant les protéines d'un moût de muscat Gordo Blanco avec des préparations commerciales contenant des protéases fongiques observent, après 7 jours, des différences significatives entres les profils chromatographiques des moûts témoin et traité malgré des diminutions des concentrations protéiques initiales inférieures à 5 p. cent. Ce résultat est en contradiction avec les précédentes conclusions et indique clairement une activité protéasique sur les protéines des moûts. Il faut toutefois noter que les conditions (doses d'enzymes, durée du traitement, pH et température du moût, nature des protéines) varient selon les études et peuvent expliquer ces divergences de résultats.

L'analyse de la composition en acides aminés des protéines totales des moûts de CH fait apparaître des différences significatives portant sur 4 acides aminés : Asx, Glx, Gly, Lys (tableau III). Ces valeurs indiquent des variations qualitatives entre le moût témoin et le moût enzymé pour CH. Pour les protéines du moût de PN, une seule différence significative portant sur Arg est observée.

Ces différences restent difficiles à interpréter. Des modifications des rapports entre les nombreuses protéines présentes sont probables. La glycosylation confère souvent aux protéines une résistance à l'action de protéases (SEMINO et *al.*, 1985 ; SEYMOUR et *al.*, 1991 ; MARUYAMA et *al.*, 1990).

TABLEAU III

Composition en acides aminés des protéines totales de moûts

Acides aminés	CHT	CHE	PNT	PNE
Asx *	15,06 ± 0,83	10,67 ± 0,58	12,90 ± 0,71	13,00 ± 0,72
Glx *	7,27 ± 0,39	5,49 ± 0,30	6,90 ± 0,38	6,80 ± 0,38
Hyp	2,77 ± 0,15	2,92 ± 0,16	2,20 ± 0,12	2,20 ± 0,12
Ser	9,72 ± 0,54	11,03 ± 0,61	9,50 ± 0,53	9,30 ± 0,52
Gly *	12,88 ± 0,71	16,32 ± 0,90	14,10 ± 0,78	14,20 ± 0,79
His	0,90 ± 0,04	1,37 ± 0,07	1,00 ± 0,06	0,90 ± 0,05
Arg **	0,76 ± 0,04	0,78 ± 0,04	0,80 ± 0,04	1,00 ± 0,06
Thr	8,36 ± 0,46	9,87 ± 0,54	8,50 ± 0,47	8,50 ± 0,47
Ala	10,09 ± 0,55	8,64 ± 0,47	10,60 ± 0,59	10,70 ± 0,59
Pro	6,32 ± 0,34	8,56 ± 0,47	5,70 ± 0,32	6,00 ± 0,33
Tyr	0,56 ± 0,03	1,04 ± 0,05	0,60 ± 0,03	0,60 ± 0,03
Val	4,49 ± 0,24	4,77± 0,26	4,80 ± 0,27	4,60 ± 0,25
Met	0,57 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,50 ± 0,03
Cys	1,62 ± 0,09	1,44 ± 0,08	1,20 ± 0,07	1,10 ± 0,06
Ile	3,58 ± 0,19	3,47 ± 0,19	3,30 ± 0,18	3,40 ± 0,19
Leu	6,47 ± 0,35	5,82 ± 0,32	5,90 ± 0,33	5,70 ± 0,32
Phe	4,70 ± 0,26	5,07 ± 0,28	6,00 ± 0,33	6,00 ± 0,33
Lys *	3,86 ± 0,21	1,90 ± 0,1	4,80 ± 0,27	4,80 ± 0,27

CHT : Chardonnay témoin - CHE : Chardonnay enzymé - PNT : Pinot noir témoin - PNE : Pinot noir enzymé
Les résultats sont donnés en pourcentage de chaque résidu.
Asx = Asn et Asp, Glx = Gln et Glu - * différence significative par rapport au CHT - ** différence significative par rapport au PNT

Or, de nombreuses protéines de moûts et de vins sont glycosylées ou tout au moins impliquées dans des complexes avec des polysaccharides (HSU et HEATHERBELL, 1987 ; PAETZOLD et *al.*, 1990 ; MARCHAL,1995 ; WATERS et *al.*, 1993 ; YOKOTSUKA et *al.*, 1991). Cette propriété intrinsèque des protéines pourrait expliquer cette résistance aux protéases d'*Aspergillus niger*. La déglycosylation de protéines de moût permettra prochainement de vérifier cette hypothèse.

CONCLUSION

Dans les préparations commerciales de pectinases, l'activité PG varie peu et est en outre corrélée à la teneur protéique, contrairement aux activités PME et PL. Le nombre de bandes protéiques observées par SDS-PAGE et IEF montre que ces préparations renferment, en plus des activités pectinolytiques indiquées, de nombreuses protéines contaminantes, et notamment des protéases. L'activité protéolytique des échantillons analysés varie dans un rapport de 1 à 11 en utilisant la Fsc-Cn comme substrat. Cependant, les conditions physico-chimiques réelles lors du débourbage (température, pH du moût) et la nature des substrats (protéines de raisin), différentes de celles de cette étude, ne sont apparemment pas favorables à leur expression dans un temps aussi limité que le débourbage. Il n'existe pas de différences qualitatives entre le profil protéique d'un moût témoin et du même moût enzymé. La composition en acides aminés des protéines de PN est également inchangée à l'issue du traitement, alors que les protéines de CH montrent des différences pour 4 acides aminés.

Remerciements : les auteurs remercient les Coopératives de Nogent l'Abbesse (F - 51420 Nogent l'Abbesse) et de Mailly Grand Cru (F - 51500 Mailly Champagne) pour avoir permis la réalisation des essais à l'échelle de la production.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAILEY, M. et PESSA E., 1990. Effect of temperature on polygalacturonase production by *Aspergillus niger. Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 622-624.

BARON A., BENGUEDOUAR A. et PRIOULT C., 1991. Purification et propriétés des pectineméthylestérases de mandarine (*Citrus nobilis* Lour.). *Lebens. Wiss. Technol.*, **24**, n°5, 459-465.

BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

BRISSONNET F. et MAUJEAN A., 1991. Identification of some foam-active compounds in Champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 97-102.

BRISSONNET F. et MAUJEAN A.,1993. Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 297-301.

CARPENTIER L., 1986. Etude des interactions entre protéines. Application à la séparation d'enzymes pectinolytiques. *Thèse Doctorat,* Université de Compiègne.

CHATONNET P., BARBE C., CANAL-LLAUBERES R.M., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. et PONS M., 1992. Incidences de certaines préparations pectolytiques sur la teneur en phénols volatils des vins blancs. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **26**, n°4, 253-269.

Codex œnologique international, OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1978. mise à jour juin 1994, compléments, 2-4.

CROUZET J., 1986. Les enzymes et l'arôme des vins. *Rev. Fr. Œnol.*, **102**, 42-49.

DUCROO P., 1990. Démystification des enzymes industrielles. *Rev. Fr. Œnol.*, **122**, 65-68.

DUGELAY I., GUNATA Z., SAPIS JC., BAUMES R. et BAYONOVE C., 1993. Role of cinnamoyl esterase from enzyme preparation on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, n° 11, 2092-2096.

FROST G.M. et MOSS D.A., 1987. Production of enzymes by fermentation. *In Biotechnology : a comprehensive treatise*. Edited by Rehm H.J. et Redd G. Verlag-Chemie Weinheim, vol. 7a, chapter 3, 65-211.

HSU J.C. et HEATHERBELL D.A., 1987. Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, n°1, 6-10.

ISHII S. et YOKOTSUKA T., 1972. Susceptibility of fruit juice to enzymatic clarification by pectin lyase and its relation to pectin in fruit juice. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, n°2, 269-272.

KARMONA Z., BAR NUN N. et MAYER A.M., 1990. Utilisation de *Botrytis cinerea* pers. comme source d'enzymes pour la clarification des vins. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, n°3, 103-124.

KESTER H. et VISSER J., 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**, 150-160.

LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

MARCHAL R., 1995. Contribution à l'étude des propriétés moussantes des vins de Champagne. Etude qualitative et quantitative des protéines des moûts et des vins de base champenois. *Thèse Doctorat*, Université de Reims.

MARUYAMA M., KADOWAKI H., WATABANE Y. et TAMAI, Y., 1990. Role of the carbohydrate moiety in phospholipase B from *Torulaspora delbrueckii*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, n°3, 599-603.

MILNER Y. et AVIDAG G., 1967. A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydr. Res.*, **4**, 359-361.

MODRA E. et WILLIAMS P., 1988. Are proteases active in wines and juices ? *Australian Grapegrower Winemaker*, 42-46.

OLLIVIER C., STONESTREET T., LARUE F. et DUBOURDIEU D., 1987. Incidence de la composition colloïdale des moûts blancs sur leur fermentescibilité. *Connaissance Vigne Vin*, **21**, n°1, 59-70.

PAETZOLD M., DULAU L. et DUBOURDIEU D., 1990. Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, 13-28.

RIBÉREAU-GAYON J., LAFON-LAFOURCADE S. et BERTRAND A., 1975. Le débourbage des moûts de vendange blanche. *Connaissance Vigne Vin*, **9**, n°2, 117-139.

RILLO L., CASTALDO D., GIOVANE A., SERVILLO L., BALESTRIERI C. et QUAGLIUOLO L., 1992. Purification and properties of pectin methylesterase from mandarin orange fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, n°4, 591-593.

SANTORO M., 1995. Fractionation and characterization of must and wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, n°2, 250-254.

SEMINO G.A., RESTANI P. et CERLETTI P., 1985. Effect of bound carbohydrate on the action of trypsin on lupin seed glycoprotein. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 196-199.

SEYMOUR T.A., PRESTON J.F., WICKER L., LINDSAY J.A., WEI C. et MARSHALL M.R., 1991. Stability of pectinesterases of marsh white grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1075-1079.

SREENATH H.K. et SANTHANAM K., 1992. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, n°3, 241-243.

TWINING S., 1984. Fluorescein isothiocyanat-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.*, **143**, 30-34.

UDENFRIEND S., STEIN S., BÖHLEN P., DAIRMAN W., LEIMGRUBER W. et WEIGELE M., 1972. Fluorescamine : a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range. *Science*, **178**, 871-872.

VILLETAZ J., 1990. Les colloïdes colmatants et la filtration des vins. *Rev. Fr. Œnol.*, **122**, 59-63.

WATERS E.J., WALLACE W. et WILLIAMS P.J., 1992. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, n°9, 1514-1519.

WATERS E.J., WALLACE W., TATE M.E. et WILLIAMS P.J., 1993. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 724-730.

YOKOTSUKA K., EBIHARA T. et SATO T., 1991. Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu grapes. *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, n°4, 248-253.

ZETELAKI-HORVATH, K., 1981. Effect of oxygen transfert rate on the composition of the pectolytic enzyme complex of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. and Bioeng.*, **23**, 2231-2241.

ZETELAKI-HORVATH, K., 1983. Possibilities for control of pectinolytic enzyme formation by *Aspergillus niger*. *Acta Alimentaria*, **12**, n°1, 11-19.

Manuscrit reçu le 15 février 1996 ;
accepté pour publication le 30 avril 1996