Connaissance Vigne Vin, 1981, **15**, N° 3, 161-177.

# DEGRADATION ENZYMATIQUE DU GLUCANE DE *BOTRYTIS CINEREA*

## APPLICATION A L'AMELIORATION DE LA CLARIFICATION DES VINS ISSUS DE RAISINS POURRIS

D. DUBOURDIEU * (1), J.C. VILLETTAZ **, Caroline DESPLANQUES * et P. RIBÉREAU-GAYON *

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

** Société Suisse des Ferments S.A.
Mulhauserstr 70, CH.4056, Bâle (Suisse)

Les difficultés de clarification des vins issus de raisins pourris ont été attribuées par LABORDE (1907) à un polymère de glucose formé par *Botrytis cinerea* dans la baie parasitée et connu pendant longtemps en œnologie sous le nom de dextrane. Les travaux de DUBOURDIEU (1977, 1978), de DUBOURDIEU et *al.* (1978, 1979, 1981) ont montré que ce polysaccharide, caractérisé par une distribution de poids moléculaires comprise entre 100.000 et 1.000.000, possède une structure moléculaire différente de celle du dextrane formé par les bactéries. En effet, les liaisons osidiques des dextranes bactériens sont de type $\alpha$ (1 → 6) ; par contre le polymère de glucose sécrété par *B. cinerea* dans le raisin ou dans les milieux de culture, présente une structure de type $\beta$ (1 → 3) $\beta$ (1 → 6); il s'agit d'un $\beta$-glucane qui s'apparente aux mycolaminaranes (GORIN et SPENCER, 1974) : la chaîne principale de la molécule ne comporte que des liaisons $\beta$ (1 → 3); les liaisons $\beta$ (1 → 6) interviennent seulement dans les branchements d'unités individuelles de glucose sur la chaîne principale dont deux maillons sur cinq sont ainsi substitués.

Localisé dans la baie de raisin entre la pellicule et la pulpe, le glucane de *B. cinerea* est dispersé dans les moûts, soit au cours des opérations de transport du raisin et d'extraction des jus pour la vinification en blanc, soit pendant la macération lors de la vinification en rouge. Des pressurages discontinus sans foulage des vendanges botrytisées permettent généralement d'éviter la présence de glucane dans les moûts; à l'inverse, le foulage, le pompage, l'égouttage mécanique, les pressurages continus libèrent des quantités de glucane suffisantes pour induire par la suite de graves difficultés pour la filtration des vins correspondants.

(1) Ingénieur de recherche, Société Seitz Filter Werke (Bad Kreuznach, R.F.A.) détaché à l'institut d'Œnologie de l'Université de Bordeaux II.

Lorsque les installations en place ne peuvent être facilement adaptées au pressurage de raisins non foulés, également pendant la vinification en rouge, la dispersion de glucane à partir de raisins botrytisés est inévitable ; il importe donc de rechercher des traitements qui permettent une clarification normale des vins. Des méthodes physiques d'ultradispersion (DUBOURDIEU et *al.*, 1976) visant à modifier la structure du glucane dans les vins, ont d'abord été proposées. Elles permettent une indiscutable amélioration de la filtrabilité, mais le coût de ces techniques est élevé ; elles ne sont pas développées.

La connaissance de la structure moléculaire du glucane a ouvert la voie à l'expérimentation des glucanases spécifiques des liaisons β (1 → 3) qui semblent, a priori, constituer une bonne solution de ces problèmes d'actualité de l'œnologie. DUBOURDIEU (1978) a décrit l'hydrolyse, en glucose et gentiobiose, du glucane de *B. cinerea* par l'exo β (1 → 3) glucanase de *Basidiomycette QM 806* (REESE et MANDELS, 1963). Egalement, DUBOURDIEU et RIBÉREAU-GAYON (1979) ont mis en évidence une β (1 → 3) glucanase produite par *B. cinerea* lui-même, sur milieu synthétique appauvri en glucose; cependant, le pH optimum d'activité de cette enzyme se situe entre 5 et 6 et l'hydrolyse du glucane de *B. cinerea* au pH du vin est très faible; la possibilité d'une application pratique de cette enzyme semble exclue.

Nous présentons ici, les premiers résultats de l'expérimentation en œnologie d'une nouvelle préparation enzymatique (NOVOZYM 116 - Société Suisse des Ferments, filiale de NOVO-INDUSTRI, Danemark), issue d'une culture de *Trichoderma ;* elle est à la fois susceptible d'une production industrielle et active aux pH habituels des moûts et des vins. Nous décrivons d'abord l'isolement et la purification du glucane utilisé comme substrat, puis les caractères biochimiques généraux de la préparation proposée, enfin les premiers essais de traitements effectués au laboratoire sur différents moûts ou vins de raisins pourris contenant du glucane de *B. cinerea.*

## MATERIELS ET METHODES

La préparation enzymatique NOVOZYM 116 présente l'aspect d'une poudre brune. Elle est obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium des protéines exocellulaires produites par une souche de *Trichoderma.*

### I. — CULTURE DE *BOTRYTIS CINEREA,* PRODUCTION ET PURIFICATION DU GLUCANE.

La souche $C_{77-4}$ est cultivée dans un fermenteur contenant 10 litres du milieu suivant : moût de raisin (sucres : 100 g/l) dilué au 1/5 et enrichi en sels minéraux ($KH_2PO_4$ : 0,8 g/l ; $NaNO_3$ : 2,4 g/l ; $MgSO_4$ : 0,4 g/l ; KCl : 0,4 g/l) et en asparagine (0,5 g/l) en raison du rôle activateur de cet acide aminé sur la biosynthèse du glucane (LEAL et *al.*, 1979). Le fer-

menteur est inoculé par une préculture de 8 jours, réalisée sur 1 litre de moût dilué au 1/3, ensemencée par une suspension de spores. La culture en fermenteur est conduite à 20 °C, en milieu agité (200 tours/minute). Afin de suivre la production de glucane par le champignon, on effectue chaque jour un prélèvement de 100 ml de milieu; le mycélium est retenu par filtration sur coton de verre et le glucane précipité du filtrat par addition de 0,7 volume d'éthanol à 95 p. 100. Recueilli par centrifugation (à 10.000 g pendant 15 minutes), le précipité est lavé trois fois par de l'éthanol au 1/2 puis repris par 100 ml d'eau. La solubilisation du glucane est facilitée par un traitement de 10 minutes à l'homogénéiseur Ultraturax ; la teneur en glucane de la solution est appréciée par un dosage au phénol-sulfurique (MONTREUIL et SPIK, 1963).

Après 10 jours de culture, la totalité du milieu est filtrée sur gaze afin de séparer le mycélium; le glucane est précipité, recueilli et lavé comme décrit précédemment. Dispersé dans 1 litre d'eau (à l'aide de l'Ultraturax), le glucane forme un milieu visqueux de teinte brune verdâtre que l'on soumet pendant 10 minutes à l'action des ultra-sons (Ultrasonic désintégrator MSE); au cours du traitement, on suit l'évolution de la viscosité relative et du pouvoir réducteur de la solution de glucane. La viscosité relative (VR) est mesurée au viscosimètre d'Oswald à 20° C.

$$VR = \frac{V_t - V_o}{V_e - V_o}$$

où $V_t$ = temps d'écoulement de 0,5 ml de milieu après sonication (mn)

$V_e$ = temps d'écoulement initial du milieu

$V_o$ = temps d'écoulement de 0,5 ml d'eau.

Le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode de NELSON-SOMOGY (1952); son augmentation éventuelle correspond à la rupture des liaisons osidiques covalentes de la molécule de glucane. A l'issue de la sonication, une centrifugation pendant 20 minutes à 20.000 g permet de séparer un culot brunâtre non glucidique. De la solution surnageante, limpide et incolore, le glucane est obtenu par lyophilisation.

## II. — MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES.

Les activités polysaccharides hydrolases de la préparation sont déterminées par dosage des sucres réducteurs libérés (selon la technique de NELSON-SOMOGYI), après incubation d'une dilution convenable de l'enzyme avec 125 mg de substrat.

Les substrats utilisés sont :

— la laminarine, β (1 → 3) glucane d'algue (SENN. CHEMICALS);
— le pustulane, β (1 → 6) glucane de lichen (CALBIOCHEM);

— la C-M-cellulose (aimablement fournie par l'Institut du Pin, Université de Bordeaux I);

— l'amidon de riz (PROLABO);

— la pectine de pomme (FLUKA);

— le dextrane $T_{40}$ (PHARMACIA);

— le glucane de *B. cinerea* obtenu selon la méthode décrite ci-dessus.

Les hydrolyses enzymatiques se déroulent dans les conditions suivantes : à 0,5 ml de la solution de substrat (0,25 p. 100 dans un tampon sodium acétate 0,01 M, pH 5), on ajoute 0,5 ml d'une solution de l'extrait enzymatique dans le même tampon (500 ou 50 µg par millilitre selon la nature du substrat).

L'attaque a lieu à 35° C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml du réactif cuivrique de NELSON. Par définition, une unité d'activité enzymatique représente la quantité d'enzyme qui provoque, dans ces conditions, une augmentation du pouvoir réducteur correspondant à 1 µmole de glucose.

III. — DÉTERMINATION DU MODE D'ACTION ENZYMATIQUE.

100 ml d'une solution de glucane purifié (2,5 g par litre) ajustée à pH 5, sont placés à 30° C en présence de 10 mg de la préparation enzymatique étudiée ; par les techniques précédemment décrites, on suit l'évolution de la viscosité et du pouvoir réducteur du milieu réactionnel.

Les produits formés au cours de l'hydrolyse du glucane sont analysés par filtration sur gel, Sephadex $G_{15}$ et Sepharose 6 B (Pharmacia). Le Sephadex $G_{15}$ (poids moléculaire d'exclusion : 1500) permet la séparation du glucose, des disaccharides et des oligosaccharides éventuellement libérés; les chaînes de glucane non hydrolysées ou partiellement hydrolysées sont exclues de ce gel ; leurs poids moléculaires sont déterminés par filtration sur Sepharose 6 B (poids moléculaire d'exclusion : $10^6$ ). On étudie ainsi l'incidence d'une hydrolyse enzymatique partielle, sur la distribution des poids moléculaires du glucane.

Après 15, 30, 60 minutes et 24 heures d'hydrolyse enzymatique, les prélèvements de la solution de glucane sont inactivés par la chaleur; ils sont injectés sur une colonne de Sephadex $G_{15}$ (1,6 $\times$ 120 cm) éluée par l'eau ; des fractions de 5 ml sont recueillies ; leur teneur en sucre est estimée par la méthode au phénol-sulfurique. Les fractions correspondant au volume d'exclusion de la colonne $G_{15}$ (PM $\geqslant$ 1500) sont rassemblées et lyophilisées. Le résidu, dissous dans 2 ml d'une solution aqueuse de chlorure de sodium (1 M), est injecté sur une colonne (2,6 $\times$ 80 cm) de Sépharose 6 B, éluée par la même solution, et étalonnée préalablement avec les dextranes $T_{10}$, $T_{70}$, $T_{500}$ et $T_{2000}$ (Pharmacia).

IV. — INCIDENCE DE LA DÉGRADATION ENZYMATIQUE DU GLUCANE SUR LA FILTRABILITÉ DES VINS.

Elle est appréciée par des tests de filtration à pression constante (0,6 bar) sur plaques (Seitz $K_5$) et sur kieselguhr (Celatom $FW_{14}$) Dans ce dernier cas, on utilise la bombe filtrante DICALITE : la description de l'appareil et les modalités de son application aux mesures de filtrabilité des vins, sont développées dans un précédent travail (DUBOURDIEU et *al.*, 1976). Les résultats des tests (volumes filtrés et fonction du temps) sont exprimés en coordonnées normales pour les filtrations sur plaques et en coordonnées logarithmiques pour les filtrations à alluvionnage continu sur kieselguhr.

La turbidité des échantillons, exprimée en mg de silice par litre, est mesurée au photomètre Sigrist (MANDRAU, 1975).

## RESULTATS ET DISCUSSION

I. — PURIFICATION DU β-GLUCANE DE *B. CINEREA*, SUBSTRAT DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES.

Le tableau I montre que la teneur en glucane du filtrat de culture atteint un palier une semaine environ après l'inoculation du fermenteur.

Le glucane est précipité du filtrat de culture, lavé et dispersé dans l'eau selon les techniques décrites dans la partie expérimentale.

**TABLEAU I**

**Production de glucane par *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin dilué, enrichi en sels minéraux et asparagine**

| Durée de la culture (jours) | Teneur du milieu de culture | |
|---|---|---|
| | glucane (mg/l) | sucres réducteurs (g/l) |
| 0 | 0 | 36 |
| 4 | 125 | 35 |
| 7 | 200 | 32 |
| 8 | 210 | 30 |

La figure 1 montre qu'un traitement aux ultrasons de la dispersion aqueuse du glucane (1,5 g par litre) provoque en quelques minutes une réduction de la viscosité relative d'environ 60 p. 100, sans augmentation correspondante du pouvoir réducteur. Ce sont donc les liaisons hydrogènes intermoléculaires qui sont rompues par ce traitement; la constance du pouvoir réducteur de la solution de glucane indique au contraire que les liaisons osidiques covalentes des chaînes de glucane ne sont pas affectées par ce traitement. De plus, la sonication permet d'éliminer par centrifugation un pigment insoluble non glucidique. Lyophilisé sous forme

purifiée, le glucane de *B. cinerea* peut être aisément mis en solution aqueuse à 0,25 p. 100 et constituer un substrat reproductible pour les mesures d'activités enzymatiques. Au contraire, séché ou lyophilisé avant cette purification, le glucane devient pratiquement insoluble.

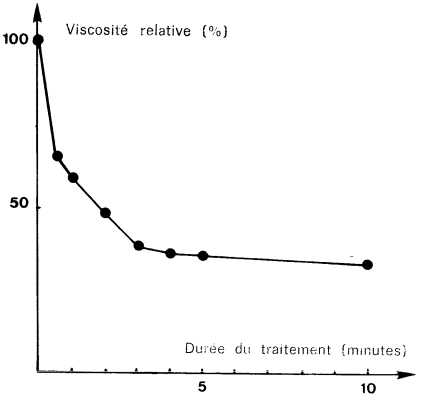



Fig. 1 — Incidence des ultrasons sur la viscosité relative d'une solution brute de glucane (1,5 g/l) isolé d'un milieu de culture de B. cinerea.

## II. — CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE LA PRÉPARATION ENZYMATIQUE.

### 1°) Spécificité

Le tableau II présente les activités hydrolases de la préparation enzymatique à l'égard de différents polysaccharides. Les activités principales sont l'activité β (1 → 3) glucanase mesurée sur la laminarine et l'activité β (1 → 6) glucanase mesurée sur le pustulane. La préparation possède aussi des activités amylases et pectinases. L'activité cellulase est plus faible et l'activité dextranase pratiquement nulle.

**TABLEAU II**

**Activités polysaccharides hydrolases de la préparation enzymatique**

| | Activité hydrolase en % de l'activité laminarinase | Activité hydrolase en unité par mg de préparation enzymatique |
|---|---|---|
| Laminarine | 100 | 11,3 |
| Pustulane | 38 | 4,3 |
| Amidon | 32 | 3,7 |
| Cellulose | 5 | 0,6 |
| Dextrane | — | — |
| Pectine | 13 | 1,5 |
| Glucane de *B. cinerea* | 20 | 2,3 |

Remarquons que l'ensemble des activités d'hydrolyse des liaisons osidiques du glucane de *B. cinerea* est 5 fois moindre que l'activité lami-

narinase. L'explication de ce phénomène réside certainement dans les différences de structures moléculaires entre la laminarine et ce glucane. En effet, le poids moléculaire du glucane de *B. cinerea* est au moins 30 fois plus élevé que celui de la laminarine; de plus celle-ci possède une structure linéaire alors que la molécule de glucane de *B. cinerea* présente des points de branchement. Par contre, les liaisons hydrogènes intermoléculaires n'ont pas d'incidence sur l'activité de la préparation enzymatique ; en effet, l'augmentation du pouvoir réducteur d'une solution de glucane de *B. cinerea,* sous l'action de la préparation enzymatique, est identique que le polysaccharide ait été ou non soumis à l'action des ultra-sons au cours de sa purification.

2°) **Influence du pH et de la température :**

a) *Rôle du pH* (figure 2).

Le glucane de *B. cinerea* est en solution à 0,25 p. 100 dans un tampon phosphate citrate 0,1 M ajusté à différents pH. L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions strandards. L'hydrolyse du substrat est maximum à pH 4,4 - 4,8. Entre pH 3,2 et 3,6 (pH habituels des moûts et des vins), l'activité glucane hydrolase se situe entre 50 et 80 p. 100 de l'activité maximum.

La stabilité de la préparation enzymatique en fonctions du pH est déterminée après incubation d'une solution de cette préparation (500 µg par millilitre), à différents pH, pendant 10 minutes. L'activité glucane hydrolase résiduelle est ensuite mesurée dans les conditions standards (30 °C, 10 minutes, pH 5). Stable entre pH 4 et 5, la préparation enzymatique ne peut tolérer une incubation, même de courte durée, en dessous de pH 3.

b) *Rôle de la température* (figure 3).

L'activité enzymatique est mesurée à pH 5 pour des températures de 5 à 70° C; 40° C représente la température optimum d'activité. A 20° C, l'activité hydrolase de la préparation à l'égard du glucane de *B. cinerea* représente environ 50 p. 100 de l'activité maximum.

La stabilité thermique de la préparation enzymatique est déterminée par incubation à des températures de 5 à 70° C (10 minutes, pH 5); après refroidissement à 20° C, l'activité résiduelle est mesurée dans les conditions standards. L'activité hydrolase à l'égard du glucane de *B. cinerea* apparaît stable jusqu'à 35° C, mais elle est réduite de 50 p. 100 pour une incubation de 10 minutes à 50° C.

3°) **Influence de l'anhydride sulfureux** (figure 4).

L'activité d'hydrolyse du glucane de *B. cinerea* est mesurée en présence de teneurs croissantes (0 - 200 mg/l) en anhydrique sulfureux, sans aucune combinaison à des groupes carbonyles.

A pH 3,5, le $SO_2$ exerce une certaine action inhibitrice : en présence de 400 mg de $SO_2$, l'activité glucanase est réduite d'environ 30 p. 100. A pH 5, au contraire, l'action du $SO_2$ est pratiquement nulle ; la modification des équilibres ioniques de la molécule d'acide sulfureux est sans doute responsable de ces différences.

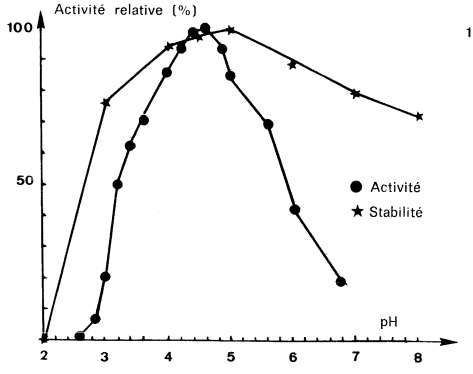



Fig. 2. — Rôle du pH sur l'activité et la stabilité de la préparation enzymatique.

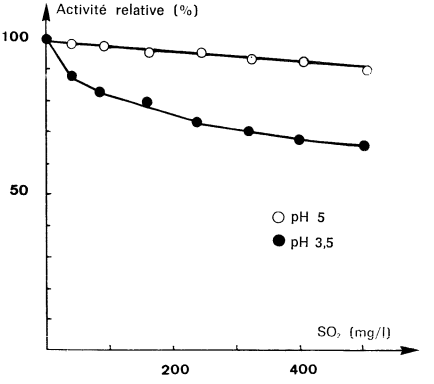



Fig. 4. — Incidence du $SO_2$ sur l'activité de la préparation enzymatique.

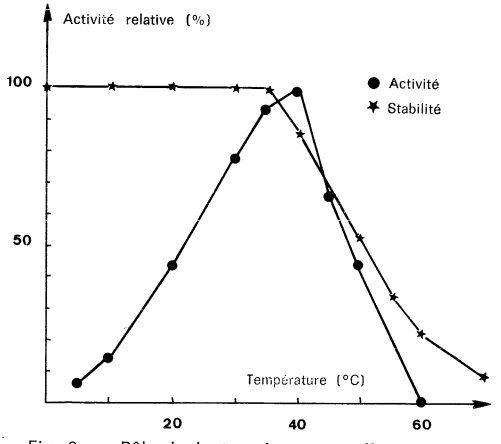



Fig. 3. — Rôle de la température sur l'activité et la stabilité de la préparation enzymatique.

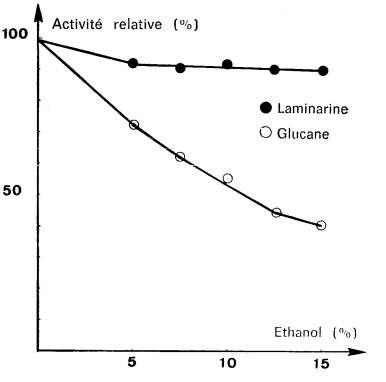



Fig. 5. — Incidence de l'éthanol sur l'hydrolyse de la laminarine et du glucane de *B. cinerea* par la préparation enzymatique.

4°) **Influence de l'éthanol** (figure 5).

L'hydrolyse enzymatique du glucane de *B. cinerea* est réalisée en présence de différentes teneurs en éthanol ; à 0,5 ml d'une solution de glucane (0,25 p. 100) à pH 5, on ajoute 0,5 ml d'une dilution (500µg par millilitre) de la préparation enzymatique dans le même tampon et 1 ml de solution hydroalcoolique (10 à 30 p. 100) à pH 5.

L'éthanol provoque une diminution importante de l'hydrolyse enzymatique du glucane de *B. cinerea.*

Les mêmes essais sont effectués en utilisant la laminarine comme substrat ; l'alcool dans ce cas n'est que faiblement inhibiteur de l'hydrolyse enzymatique; ce n'est donc pas la stabilité de la β (1 → 3) glucanase qui est affectée par l'éthanol, mais plutôt l'affinité enzyme-substrat.

L'interprétation du phénomène pourrait être fournie par la modification de la structure et des propriétés du glucane en présence de faibles concentrations d'éthanol (5 à 20 %) ; en effet, ce polysaccharide précipite entre 18 et 25 p. 100 d'alcool; de plus, RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1963), puis DUBOURDIEU (1978) ont montré que le colmatage des surfaces filtrantes par une solution de glucane est d'autant plus important que le degré alcoolique est plus élevé. En revanche, la laminarine qui précipite au voisinage de 80 p. 100 d'éthanol est peu affectée par des teneurs en alcool inférieures à 20 p. 100.

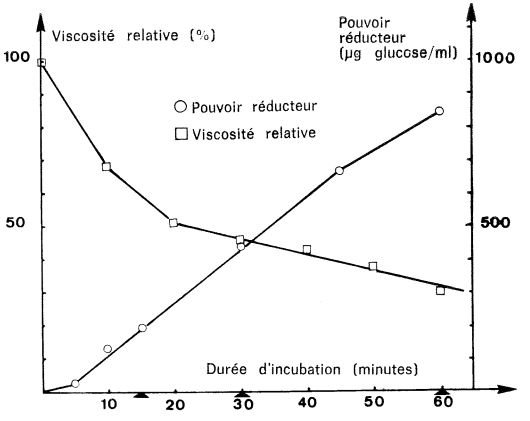



Fig. 6. — Cinétique de l'hydrolyse du glucane de *B. cinerea* par la préparation SP 116

### 5°) Mode d'action de la préparation enzymatique.

La figure 6 représente la diminution de viscosité relative et l'accroissement du pouvoir réducteur d'une solution de glucane au cours de son attaque par la préparation NOVOZYM 116.

La filtration sur gel Sephadex $G_{15}$ de l'hydrolysat après 15, 30 ou 60 minutes de dégradation donne des diagrammes d'élution présentant 3 pics bien séparés, correspondant au glucose (pic N° 3), au gentobiose (pic N° 2), analysés par le gel, et aux molécules exclues du gel (poids moléculaire $\geqslant$ 1500, pic N° 1). Il n'y a donc pas libération d'oligosaccharides au cours de l'hydrolyse du glucane.

Les analyses sur Sepharose 6B, des molécules de glucane exclues du Sephadex $G_{15}$ (voir figure 7, pic 1), montrent que la distribution des poids moléculaires du glucane partiellement hydrolysé (30 minutes) est modifiée par rapport à celle du glucane témoin (figure 8). En effet, le poids molé-

cuclaire des chaînes de glucane avant hydrolyse se répartissent entre 100.000 et près de $10^6$. Une hydrolyse partielle conduit à une réduction de la proportion des chaînes les plus courtes puisque les poids moléculaires se trouvent compris entre 300.000 et $10^6$.

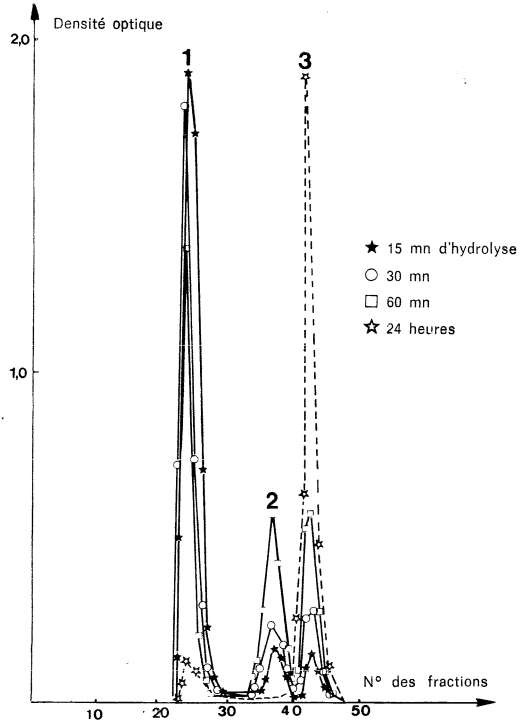



Fig. 7. — Analyse par filtration sur gel Sephadex G 15 des produits d'hydrolyse du glucane de *B. cinerea*

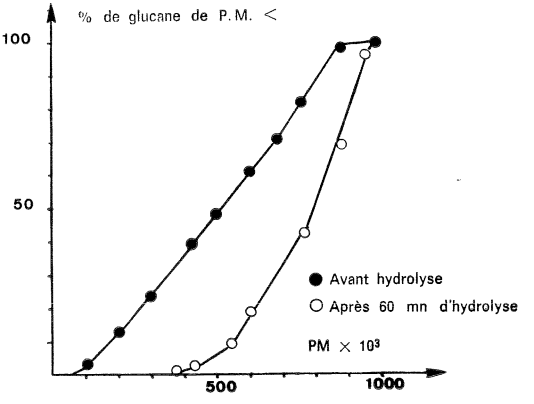



Fig. 8 — Incidence d'une hydrolyse enzymatique partielle sur la distribution des poids moléculaires du glucane de *B. cinerea*
(Résultats obtenus par filtration sur gel Sepharose 6 B).

Toutes ces observations indiquent que l'hydrolyse des liaisons β (1 → 3) des molécules de glucane fait intervenir un mode d'action enzymatique de type exo, à partir des extrémités de chaînes, comparable à celui de l'exo-β- (1 →3) glucanase de *Basidiomycete QM 806* (NELSON et *al.*, 1969).

Le glucose (figure 7) est le seul produit de l'hydrolyse complète du glucane de *B. cinerea* en raison de l'activité β (1 → 6) glucanase de la préparation enzymatique.

## III. — ESSAIS AU LABORATOIRE DE LA GLUCANASE SUR DES MOUTS CONTENANT DU GLUCANE DE *BOTRYTIS CINEREA*.

Pour bénéficier des conditions les plus favorables à l'activité enzymatique, les essais ont été effectués pendant la fermentation (teneurs en $SO_2$ et en éthanol réduites, températures comprises entre 18° et 20° C).

### 1°) Incidence de la préparation enzymatique sur la dégradation du glucane .

Un moût de raisins blancs (cépage Sémillon) contenant environ 100 mg par litre de glucane de *Botrytis* est traité en cours de fermentation par différentes doses de NOVOZYM 116 (2 à 8 g/hl). L'expérimentation est réalisée au laboratoire à 18° C (tableau III). La dégradation du glucane est suivie qualitativement par le test de précipitation par l'éthanol; elle est d'autant plus rapide que la quantité de produit ajoutée est plus élevée (une semaine pour 2 g par hectolitre, 12 heures pour 8 g par hectolitre).

**TABLEAU III**

**Addition de la préparation NOVOZYM 116 à un moût de raisins blancs en fermentation.**

**Influence de la quantité de préparation enzymatique ajoutée sur la vitesse de dégradation du glucane de *Botrytis cinerea***

| Dose de NOVOZYM 116 | Présence de glucane après des temps d'action enzymatique de | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 12 heures | 24 heures | 36 heures | 48 heures | 72 heures | 1 semaine |
| 2 g/hl | + | + | + | + | + | — |
| 4 | + | + | traces | — | — | — |
| 6 | traces | — | — | — | — | — |
| 8 | — | — | — | — | — | — |

(+ ou — = présence ou absence de glucane estimée par le test de précipitation à l'éthanol).

Après une semaine d'action, les échantillons traités aux différentes doses subissent des tests de filtrabilité sur plaques, précédés d'une centrifugation (10 minutes, 10.000 g) destinée à éliminer les levures en suspension dans le moût en fin de fermentation. La figure 9 montre que les échantillons traités possèdent des filtrabilités améliorées par rapport à

celle du vin témoin; les volumes filtrés en 5 minutes passent de 60 ml pour le vin témoin à 400, 450 et 475 ml pour les échantillons ayant subis en cours de fermentation des additions de 2, 4 et 6 g de NOVOZYM 116 par hl.

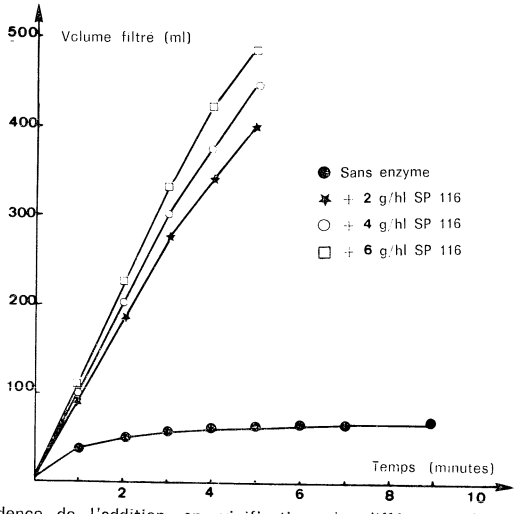



Fig. 9 — Incidence de l'addition en vinification de différentes doses de glucanase SP 116 à l'égard de la filtrabilité sur plaque d'un vin blanc issu de raisins pourris.

## TABLEAU IV

### Influence d'un traitement par la préparation NOVOZYM 116 sur la filtrabilité à alluvionnage continu

(test de filtration sur bombe filtrante DICALITE, adjuvant FW14 3 g/l, surface de filtration 9 cm², pression 0,6 bar)

| | Turbidité (mg silice/l) | | volume filtré 100 mn |
|---|---|---|---|
| | avant filtration | après filtration | |
| Lot TA | 140 | 12 | 500 |
| Lot EA | 56 | 8 | 6 000 |
| Lot TB | 300 | 10 | 350 |
| Lot EB | 75 | 10 | 7 000 |

TB = vin témoin collé à la bentonite (40 g/hl) après fermentation
TA = vin témoin non collé à la bentonite (40 g/l) après fermentation
EB = vin traité en cours de fermentation et collé à la bentonite après fermentation bentonite après fermentation.
EA = vin traité en cours de fermentation et non collé à la bentonite après fermentation.

Des essais similaires effectués sur des moûts de Chasselas (Suisse) et de Muscat (Allemagne) contenant du glucane de *B. cinerea* montrent de la même façon une amélioration de la filtrabilité sur plaques des échantillons traités en cours de fermentation par la préparation NOVOZYM 116 aux doses de 1 à 6 g par hectolitre.

2°) **Incidence de la dégradation enzymatique du glucane du moût sur la clarification spontanée et la filtrabilité d'un vin.**

La glucanase est ajoutée à raison de 4 g par hectolitre à un moût de Sémillon contenant du glucane de *B. cinerea.* La fermentation alcoolique est conduite au laboratoire à température contrôlée (18° C) dans des ballons de 3 litres. Après épuisement des sucres, les vins témoins (T) et ceux traités par 4 g de NOVOZYM 116 par hl sont sulfités à raison de 5 g par hectolitre; 4 lots (TA, TB, EA, EB) sont alors constitués; les échantillons B subissent un traitement classique à la bentonite (40 g par hectolitre) pour éliminer les protéines. L'évolution dans le temps des turbidités des 4 lots est représentée par la figure 10 (le prélèvement de l'échantillon est effectué au centre des ballons).

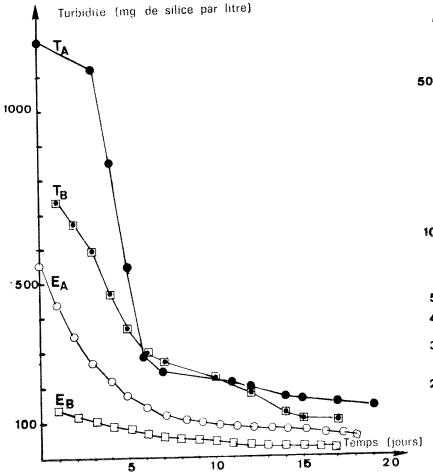



Fig. 10. — Influence de la dégradation enzymatique du glucane d'un moût sur la vitesse de clarification spontanée d'un vin.

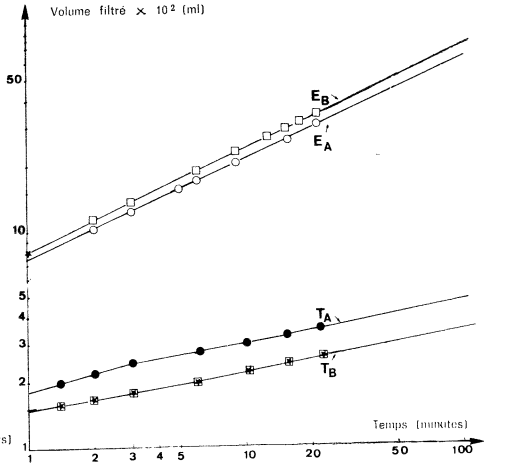



Fig. 11. — Influence de la dégradation enzymatique du glucane d'un moût sur la filtrabilité à alluvionnage continu d'un vin. (Test effectué sur bombe filtrante Dicalite ; surface filtrante : 9 $cm^2$ ; pression : 0,6 bar ; adjuvant de filtration : Celatom $FW_{14}$ 3 g/l

■ $T_B$ : vin témoin collé à la bentonite après fermentation.

● $T_A$ : vin témoin non collé.

□ $E_B$ : vin traité par la glucanase en cours de fermentation et collé à la bentonite après fermentation.

○ $E_A$ : vin traité par la glucanase en cours de fermentation et n'ayant pas subi de collage à la bentonite après fermentation.

Dans le cas de la sédimentation spontanée, en l'absence de traitement à la bentonite, la clarification du lot EA ayant subi une addition de NOVOZYM 116 pendant la fermentation est beaucoup plus rapide que celle du vin témoin TA ; 3 jours après le sulfitage de fin de fermentation, la turbidité demeure environ 4 fois plus élevée dans le lot TA que dans le lot EA.

Un traitement à la bentonite à la fin de la fermentation augmente encore l'écart de turbidité entre le lot témoin et celui ayant subi l'addition de NOVOZYM 116 ; 3 jours après le traitement à la bentonite, la turbidité de TB est 6 fois plus importante que celle de EB (tableau IV et figure 10).

On a montré par ailleurs qu'un traitement à la bentonite en début de fermentation, avant l'addition de la préparation enzymatique, empêche toute dégradation du glucane, même si les doses d'extrait enzymatique sont multipliées par 10.

Les tests de filtrabilité sur kieselguhr sont effectués 20 jours après la fin de la fermentation pour les échantillons TA et EA et 6 jours après l'addition de bentonite pour les échantillons TB et EB. L'action de la préparation NOVOZYM 116 se traduit par une considérable augmentation de la filtrabilité (figure 11). A titre d'exemple, dans la série A (sédimentation spontanée), les volumes filtrés en 100 minutes passent de 500 à 6.000 ml ; dans la série B (traitement à la bentonite) le même indice passe 350 à 7.000 ml. L'addition de bentonite aux vins traités par la préparation NOVOZYM 116 permet une clarification spontanée plus rapide et améliore aussi la filtration sur kieselguhr ; cette addition permet, en outre, d'éliminer l'enzyme du milieu.

## CONCLUSION

L'objet de ce travail était l'étude d'une préparation enzymatique NOVOZYM 116 susceptible de dégrader le glucane de *B. cinerea* et de résoudre ainsi les difficultés de clarification associées à la présence de ce polysaccharide dans les vins de raisins pourris.

Nous avons tout d'abord décrit une méthode originale de purification du glucane de *B. cinerea* utilisé somme substrat. En effet ce polysaccharide, précipité par l'alcool d'un milieu de culture, reste asocié à un pigment brûnatre non glucidique ; ce dernier peut être éliminé (sous forme d'un dépôt insoluble) par traitement aux ultrasons, puis centrifugation d'une dispersion aqueuse du précipité éthanolique. Au cours de la sonication, les ponts hydrogènes intermoléculaires sont rompus (baisse de la viscosité relative), mais la structure covalente de la molécule de glucane (liaisons osidiques) est préservée. Lyophilisé sous forme purifiée, le polysaccharide peut aisément être remis en solution dans l'eau ou dans un tampon; par contre, séché avant sa purification, il devient pratiquement insoluble.

Les activités polysaccharides hydrolases éventuelles de la préparation enzymatique étudiée sont les activités laminarinase (ou $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) glucanase), pustulanase (ou $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) glucanase) et amylase.

Les deux types de liaison osidiques $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) et $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) de la molécule de glucane de *B. cinerea* sont donc dégradés par cette préparation, mais la somme des activités $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) et $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) glucanases sur le glucane de *B. cinerea* est environ 5 fois moindre que la seule activité lamina-

rinase. Ceci tient vraisemblablement à la structure très particulière du glucane : poids moléculaire élevé, branchements.

Le mode d'action ezymatique de la β (1 → 3) glucanase, présente dans la préparation est de type exo ; la dégradation de la molécule de glucane se fait progressivement à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne.

Les rôles respectifs de la température, du pH, de l'alcool et de l'anhydride sulfureux, sur les activités hydrolases de la préparation à l'égard du glucane de *B. cinerea,* ont été examinés. La température optimum d'activité se situe à 40 °C, mais à 20 °C il reste environ 50 p. 100 de l'activité maximum ; le pH optimum se situe entre 4,5 et 5, mais à pH 3,5 l'activité représente encore 80 p. 100 de l'activité maximum. Enfin, l'éthanol, et dans une moindre mesure le $SO_2$, exercent une certaine inhibition.

Ces résultats conduisent, de préférence, à une utilisation de la préparation enzymatique en cours de fermentation, de façon à bénéficier d'une température favorable et de teneurs en alcools et $SO_2$ minimum. Notons cependant que le traitement des moûts à la bentonite interdit l'utilisation de la préparation étudiée qui est adsorbée et vraisemblablement dénaturée par cette argile.

Les essais effectués au laboratoire sur les moûts en fermentation contenant du glucane de *B. cinerea,* montrent que des additions de 4 g de la préparation NOVOZYM 116 par hl assurent la dégradation totale du polysaccharide. Il en résulte une nette amélioration de la clarification des vins par sédimentation spontanée et un accroissement considérable de leur filtrabilité.

Manuscrit reçu le 20 juillet 1981, accepté pour publication le 7 septembre 1981.

## RESUMÉ

*Botrytis cinerea* secrète dans les baies de raisins parasitées un β-glucane responsable des difficultés de clarification des vins issus de vendanges pourries.

Une préparation enzymatique (glucanase NOVOZYM 116) susceptible d'hydrolyser ce polysaccharide dans les vins est proposée. L'incidence de différents facteurs (température, pH, $SO_2$, éthanol) sur l'activité et la stabilité de la préparation enzymatique, ainsi que son mode d'action, sont examinés. Les essais effectués au laboratoire montrent que la dégradation enzymatique du glucane, en cours de fermentation, permet d'améliorer considérablement la clarification spontanée et la filtrabilité des vins.

## SUMMARY

*Botrytis cinerea* secretes a β-glucane in the grapes that it infests that is responsible for clarification problems in wines made from spoiled harvests.

An enzymatic preparation (Glucanase NOVOZYM 116) capable of hydrolysing this polysaccharide in wines is proposed. The influence of different factors (tempe-

rature, pH, $SO_2$, ethanol) on the activity and stability of the enzymatic preparation are examined. The laboratory tests show that the enzymatic decay of glucane during fermentation brings about a great improvement in the spontaneous clarification and filterability of wines.

## ZUSAMMENFASSUNG

Botrytis cinerea scheidet in die parasitierten Beeren einen β-Glucan aus, der verantwortlich ist, für die Klärungsschwierigkeiten der botrytisierten Weinen.

Ein enzymatisches Präparat (Glucanase NOVOZYM 116) eignet sich zur Hydrolisierung dieses Polysaccharides in den vorgeschlagenen Weinen. Der Einfall verschiedener Faktoren (Temperatur, pH-Wert, $SO_2$-Gehalt, Athanol) auf die Aktivität und Stabilität des enzymatischen Präparates sowie die Aktionsart, werden untersucht. Die Laborversuche zeigen das der enzymatiche Abbau des Glucans während der Gärung, die spontane Klärung und die Filtrierbarkeit der Weine erheblich verbessert.

## RESUMEN

*Botrytis cinerea* segrega en las bayas de uva parasitados una β-glucana responsable de las dificultades de classificación de vinos obtenidos apartir de vendimias con podredumbre.

Una preparación enzymatica (glucanase NOVOZYM 116) susceptible de hidrolisar este polisacarido en el vino se proponen. La incidencia de diferentes factores (température, pH, $SO_2$, étanal) sobre la actividad y la estabilidad de la preparación enzimatica, asi como el modo de acción son examinados. Las pruevas efectuadas en el laboratorio muestran que la degradación enzymatica de la glucana durante la fermentación, permiten de mejorar considerablemente la clarificación espontanea y la filtrabilidad de los vinos.

## RIASSUNTO

Botrytis Cinerea secerne nelle bacche d'uva parassitate un β glucane responsabile delle difficoltà di chiarificazione dei vini, generati da vendemmie marcie.

Una preparazione enzimatica (glucanase NOVOZYM 116) capace di idrolizzare questo polysaccaride nei vini è proposta. L'incidenza dei differenti fattori (temperatura, pH, SO2, etanol) sull'attività e la stabilità della preparazione enzimatica, cosi come il suo modo di azione sono esaminati. Le prove effettuate in laboratorio mostrano che la digradazione enzimatica del glucane durante la fermentazione permette di mogliorare considerevolmente la chiarificazione spontanea e la filtrabilità dei vini.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUBOURDIEU D., LEFEBVRE A. et RIBÉREAU-GAYON P., 1976. Influence d'un traitement physique d'ultra-dispersion sur la filtration des vins. *Connaissance Vigne Vin,* **10**, N° 1, 73-92.

DUBOURDIEU D., 1977. La production par *Botrytis cinerea* d'un glucane responsable des difficultés de clarification de certains vins issus de raisins pourris. *in* « IIIe Symposium International d'Œnologie ». Bordeaux, p. 275-277, INRA, Paris.

DUBOURDIEU D., FOURNET B., BERTRAND A. et RIBÉREAU-GAYON P., 1978. Identification d'un glucane secrété dans la baie de raisin par *Botrytis cinerea.* C. R. Acad. Sc., Paris, **286** D, 229-231.

DUBOURDIEU D., 1978. Etude des polysaccharides secretés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Incidence sur les difficultés de clarification des vins de vendanges pourries. *Thèse de Docteur-Ingénieur,* Université de Bordeaux II.

DUBOURDIEU D., FOURNET B. et RIBÉREAU-GAYON P., 1981. Molecular structure of the extracellular β. D. Glucan from *Botrytis cinerea.* Carbohyd. Res., **93**, 294-299.

DUBOURDIEU D. et RIBÉREAU-GAYON P., 1980. Mise en évidence d'une β (1 → 3) glucanase exocellulaire chez *Botrytis cinerea.* C. R. Acad. Sc., Paris, **290** D, 25-28.

GORIN P. A. J. et SPENCER J. F. T., 1968. Structural Chemistry of fungal polysaccharides, in Advances in carbohydrates Chemistry, 23, p. 367, Academic Press, New York.

LABORDE J., 1907. Cours d'œnologie, Mulo, Paris.

LEAL J. A., RUPEREZ P. and GOMEZ-MIRANDA B., 1979, Extracellular glucan production by *Botrytis cinerea.* Trans. Br. mycol. Soc., **72**, 172-176.

MONTRANT D. et THOMAS L., 1977. Structure d'un glucane exocellulaire produit par le *Botrytis cinerea* (pers.). *Ann. Sci. Naturelles Bot.,* **18**, 185-191.

MONTREUIL J. et SPICK G., 1963. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monographie du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.

NELSON T. E., JOHNSON J., JANTZEN et KIRKWOOD S., 1969. Action pattern and Specificity of an Exo-β -(1 → 3) D-glucanase from Basidiomycete Species QM 806. *J. Biol., Chem.,* **24** , 5972-5980.

RIBEREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1961. Traité d'œnologie, Tome II, Dunod, éd., Paris.