Connaissance Vigne Vin, 1980, **14**, N° 1, 37-52.

MISE EN EVIDENCE D'UNE PRODUCTION DE PROTEASES EXOCELLULAIRES PAR LES LEVURES AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DU MOUT DE RAISIN

M. FEUILLAT *, G. BRILLANT ** et J. ROCHARD **

* Laboratoire d'Œnologie, Faculté des Sciences « Mirande »
B.P. 138, 21004 Dijon Cédex (France)

** Laboratoire de Chimie-Technologie, Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles, B.P. 48, 21800 Quétigny (France)

Travail effectué avec la collaboration technique de C. HORY **

INTRODUCTION

Les activités protéolytiques en vinification ont jusqu'alors été plutôt étudiées au niveau du raisin. BAGLIONI et *al.* (1937) ont caractérisé une activité protéolytique dans le jus de raisin. CORDONNIER et DUGAL (1968) ont fait une étude plus précise des protéases du raisin en observant en particulier que leur activité n'était importante qu'avant le départ de la fermentation alcoolique, ces enzymes étant rapidement inhibées par l'alcool. Par contre, les protéases de raisin présentent une thermorésistance élevée, ce qui peut expliquer le très fort enrichissement des moûts en azote soluble observé par plusieurs auteurs au cours du chauffage des vendanges rouges (FEUILLAT, BERGERET, 1967 ; CORDONNIER, 1970 ; POUX, 1974).

En ce qui concerne l'étude des protéases de levures, il y a lieu de distinguer les protéases intracellulaires et les protéases exocellulaires. Les premières ont été caractérisées par LENNEY (1956) dans des levures de boulangerie, puis deux activités ont été purifiées et étudiées par LENNEY et *al.* (1967) chez *Saccharomyces cerevisiae.* Les secondes ont pu être mises en évidence chez le genre *Candida* (AHEARN et *al.*, 1968).

Pour ce qui est de *Saccharomyces cerevisiae,* CHEN et MILLER (1968) ont caractérisé une activité protéolytique de cellules intactes (activité fixée au niveau de la paroi cellulaire) pendant la phase de sporulation, mais selon ROSE et HARRISON (1971) aucune protéase exocellulaire n'a été mise en évidence jusqu'alors pour cette espèce de levure, ni pour *Saccharomyces carlsbergensis.*

Des travaux plus récents (ABDOURAZAKOVA et *al.*, 1975) étudient les activités hydrolytiques exocellulaires des levures *Saccharomyces vini*

dans des conditions de culture régulée correspondant à une fermentation continue en deux temps : une phase de croissance logarithmique et une phase stationnaire. Pendant cette dernière phase, les auteurs caractérisent la libération dans le milieu par les levures de polygalacturonases, de pectine-estérases, de peptidases et de protéinases qui par leur caractère hydrolytique peuvent être considérées comme des enzymes contribuant à la stabilité future des vins.

Enfin, dans un exposé très récent, LIAGUNO (1979) montre l'intérêt de la connaissance des systèmes enzymatiques des levures viniques en vue d'une meilleure sélection de celles qui présentent le plus grand intérêt technologique.

Dans la présente étude, nous avons cherché à mettre en évidence la production de protéases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique, alors que les activités protéolytiques du raisin sont inhibées. Nous avons comparé deux souches de levures, l'une appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, l'autre à l'espèce *Saccharomyces bayanus* et nous avons également conduit la même recherche dans le cas de fermentations de moûts de raisin à partir de la seule flore indigène.

MATERIEL D'ETUDE ET METHODES

1. Nature des levures

Les deux souches de levures essayées, *S. cerevisiae* et *S. bayanus*, sont distribuées sous une forme sèche en vue de leur utilisation comme levain de vinification (Levures sèches actives préparées par la Société Suisse des Ferments à Bâle). Ce sont des préparations qui contiennent de 2 à 3 10^{10} cellules vivantes par gramme de poids sec.

Ces levures sont simplement réhydratées dans de l'eau tiède à 35-40 °C pendant vingt minutes avant leur emploi.

Dans le cadre de nos essais, les levurages ont été systématiquement pratiqués sur la base de 30 grammes de levures sèches par hectolitre.

2. Modèles de vinifications et de fermentations

Des vinifications expérimentales ont été conduites en blanc à partir du cépage *Chardonnay* au cours des vendanges de 1977, 1978 et 1979 au Centre d'Expérimentation Viticole et Œnologique de l'Université de Dijon situé à Marsannay-la-Côte (Côte d'Or).

Ces vinifications ont été réalisées soit à partir de lots de raisins de 1500 kgs (modèle semi-industriel), soit à partir de lots de 80 kgs seulement (microvinifications) qui dans les deux cas sont foulés et soumis à deux pressurages successifs, avec sulfitage des moûts à 5 g par hectolitre en vue du débourbage.

Le moût débourbé provenant d'un même lot de vendange est réparti dans trois cuves dont deux sont levurées, l'une avec *S. cerevisiae* et l'autre avec *S. bayanus ;* la troisième cuve appelée cuve témoin est mise en fermentation sans levurage.

Des contrôles de densité et de température sont réalisés pendant toute la durée des fermentations et on effectue parallèlement des prélèvements de 80 ml de moût environ après homogénéisation de la masse. Les prélèvements sont conservés par congélation à — 20 °C en vue des analyses.

En dehors des vinifications expérimentales, nous avons conduit des fermentations en petit volume (4 litres) au laboratoire à partir de jus de raisin pasteurisé du commerce ensemencés avec l'une ou l'autre des deux souches de levures essayées, enrichis ou non en phosphate biammoniacal ajouté pour certains essais à la dose de 300 mg par litre, ou enrichis encore dans d'autres essais avec du moût de *Chardonnay* non pasteurisé volume à volume.

Enfin, un essai a été réalisé en fermentation dirigée (fermenteur de 20 litres de capacité) avec la souche *S. bayanus* à partir d'un milieu synthétique stérilisé ayant la composition suivante en grammes pour 10 litres :

autolysat de levures : 3,33 ; saccharose : 1000 ; acide tartrique : 10 ; bitartrate de potassium : 15 ; sulfate d'ammonium : 5 ; sulfate de magnésium : 5 g ; phosphate bisodique : 5.

La fermentation a été conduite à partir de 10 litres de milieu de culture ensemencés à la dose de 300 mg de *S. bayanus* par litre avec régulation de la température à 25 °C et du pH à 2,5.

3. **Techniques de mesure des activités protéolytiques du raisin et des levures** (protéases exocellulaires).

Principe

La recherche des activités protéolytiques est faite directement dans le moût de raisin non fermenté ou en cours de fermentation par mesure dans le temps, après addition d'hémoglobine, de l'enrichissement du milieu en azote non précipitable à l'acide trichloracétique.

Modes opératoires

Pour l'étude des protéases du raisin, nous avons repris la technique décrite par CORDONNIER et DUGAL (1968). 70 ml de jus de raisin pulpeux (ou clarifié par centrifugation dans quelques essais) sont ajustés à pH 2,0 par 0,2 à 0,4 ml d'HCl pur additionnés de 3,85 ml de tampon citrate disodique HCl 2M de pH 2,0 et amenés au volume final de 77 ml avec de l'eau distillée.

Une prise de 70 ml de ce jus tamponné est mise dans un erlenmeyer de 150 ml avec 7 ml d'une solution à pH 2,0 d'hémoglobine à 5 p. 100 dans du tampon citrate 0,1 M, plus quelques gouttes de toluène. On a ainsi un mélange d'incubation ayant une concentration de 0,5 p. 100 en hémoglobine et de 0,1 M en tampon.

Ce mélange est mis à incuber dans un bain thermostaté réglé à 55 °C.

Des prélèvements de 5 ml sont effectués toutes les heures pendant 5 à 6 heures, et précipités par 2 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. Après une demi-heure de repos à + 5 °C, les précipités sont éliminés par filtration et l'on procède à un microdosage de l'azote soluble contenu dans les filtrats.

Pour l'étude des protéases exocellulaires de levures, des échantillons de 70 ml de jus de raisin sont prélevés tout au long de la fermentation alcoolique, ajustés à pH 3,7 par quelques gouttes de NaOH 2N, additionnés de 1,43 ml de tampon acétate de sodium HCl 0,07 M de pH 3,7 et amenés au volume final de 77 ml avec de l'eau distillée. La suite des opérations est alors semblable à celles décrites pour les protéases du raisin, si ce n'est que les échantillons sont mis à incuber à 37 °C.

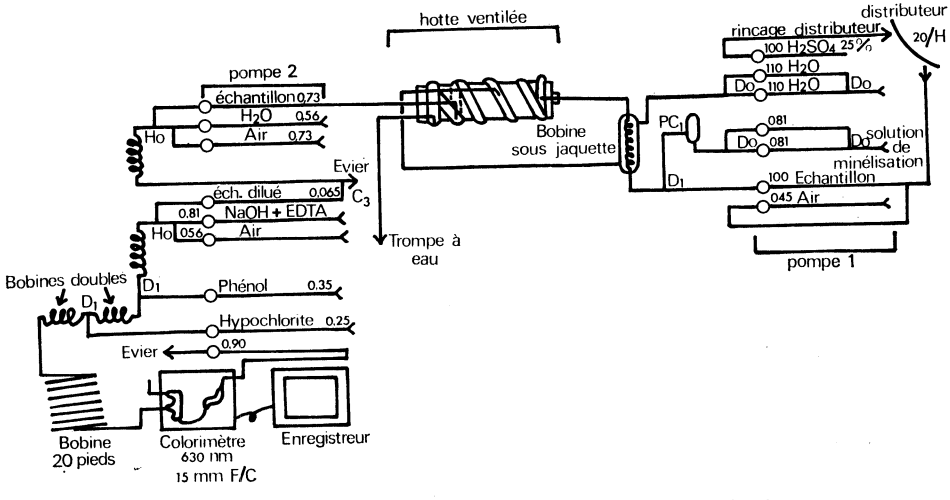


Fig. 1. — Schéma de montage utilisé pour le microdosage de l'azote.

Dans les deux cas, les microdosages d'azote soluble après précipitation des échantillons à l'acide trichloracétique, sont réalisés à l'aide d'une chaîne d'analyse séquentielle « Technicon » équipée d'une hélice de minéralisation et selon la technique déjà décrite par l'un d'entre nous (FEUILLAT et *al.*, 1977), 1 ml d'échantillon est minéralisé en continu à 400 °C, en présence d'acide sulfurique et de sélénium. L'ammoniac formé est dosé également en continu par développement de la réaction colorée de Berthelot :

formation d'un complexe bleu, entre la cation ammonium et l'hypochlorite de sodium en présence de phénate de sodium, qui est colorimétré à 630 nm. Une gamme étalon est établie à partir de solutions de sulfate d'ammonium renfermant entre 10 et 40 µg d'azote par ml, le schéma de montage est donné Figure 1.

Nous retenons généralement comme unité d'activité protéolytique l'azote libéré en µg par ml d'échantillon pendant 5 ou 6 heures.

4. **Séparation par chromatographie sur colonne de Séphadex G 25 et dosage des principaux constituants azotés du vin.**

Ces techniques que nous avons déjà utilisées dans des travaux antérieurs (FEUILLAT, 1974 ; FEUILLAT et *al.*, 1977) nous ont permis dans cette étude d'apprécier l'action des protéases du raisin et des protéases exocellulaires des levures sur le degré d'hydrolyse des principaux composés azotés contenus dans les vins provenant des vinifications expérimentales et prélevés immédiatement en fin de fermentation alcoolique.

Les échantillons de vins concentrés dans le rapport de 100 à 10 ml sont chromatographiés sur une colonne de Séphadex G 25 d'une longueur de 100 cm et d'une section de 4,9 cm^2, dont le volume d'exclusion est déterminé par passage d'une solution de dextrane bleu à 2 p. 100. L'élution est effectuée avec un débit de 40 ml/heure à l'aide d'un mélange de tampon acétate pH 6 et de NaCl 0,1 M (Vol/Vol). L'éluat est collecté par fractions de 3 ml qui sont analysées à l'aide d'un passeur d'échantillons par absorption dans l'ultra-violet à 278 nm.

L'azote contenu dans les principaux groupes de fractions repérées dans l'ultra-violet : protéines et polypeptides d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 5000 (fraction exclue), peptides, acides aminés libres est dosé en continu à l'aide de l'autoanalyseur « Technicon » et selon le montage précédemment décrit pour la mesure des activités protéolytiques.

RESULTATS

1. **Evolution des activités protéolytiques du raisin au cours de la vinification en blanc.**

L'activité des protéases du raisin mesurée à pH 2 et à 55 °C aux différents stades de la vinification et de la fermentation alcoolique évolue selon la courbe représentée sur la figure 2 (vinification semi-industrielle contrôlée par CANONICA et FERRARI, 1978).

L'activité augmente au cours des traitements mécaniques du raisin : foulage, 1er pressurage, 2e pressurage, par enrichissement des jus en activité particulaire, c'est-à-dire en activité liée aux débris de matières solides. Cette part de l'activité, particulaire des protéases du raisin semble importante puisque, par exemple, lors d'un essai, les activités comparées et

exprimées en azote soluble, libéré en µg par ml pendant 3 heures sont de 100 µg pour le jus pulpeux et de 25 µg seulement pour le même jus centrifugé.

Cette importance de l'activité particulaire du raisin explique vraisemblablement la très forte diminution de l'activité protéolytique totale au cours du débourbage des jus.

Ainsi, comme l'indique le tableau I qui rapporte un autre essai de vinification semi-industrielle, les activités protéolytiques du moût passent de 50 au moment du foulage à 95 en fin de deuxième pressurage, soit une augmentation de + 70 p. 100 par rapport aux activités initiales pour chuter à 15 µg en début de fermentation, c'est-à-dire après débourbage, soit une diminution de — 70 p. 100 toujours par rapport aux activités initiales du moût.

TABLEAU I

Comparaison des activités protéolytiques du raisin (pH 2, 55 °C) aux différents stades d'une vinification en blanc semi-industrielle

Echantillons prélevés	µg N/ml/5 heures	Variations en p. 100 par rapport aux activités initiales
1. Foulage	50	0
2. 1er pressurage	80	+ 60
3. 2e pressurage	95	+ 70
4. Début du débourbage	65	+ 30
5. Début de fermentation (moût débourbé ; d = 1,080)	15	— 70
6. Mi-fermentation d = 1,035	20	— 60
7. Fin de fermentation d = 1,000	20	— 60

Notons que nous avons pu observer la même évolution des activités protéolytiques du raisin aussi bien en vinification semi-industrielle qu'en microvinification. Enfin, nous remarquons sur la figure 2 que l'azote soluble des jus correspondant au temps zéro de dosage des activités protéolytiques évolue exactement d'une façon parallèle aux activités elles-mêmes : après enrichissement au cours des traitements mécaniques, il y a une très forte diminution au cours du débourbage due vraisemblablement à la floculation de composés azotés d'un poids moléculaire élevé échappant à la précipitation au T.C.A. mise en œuvre lors de l'analyse des jus non débourbés, à cause du rôle de colloïdes protecteurs joués par des constituants comme les pectines.

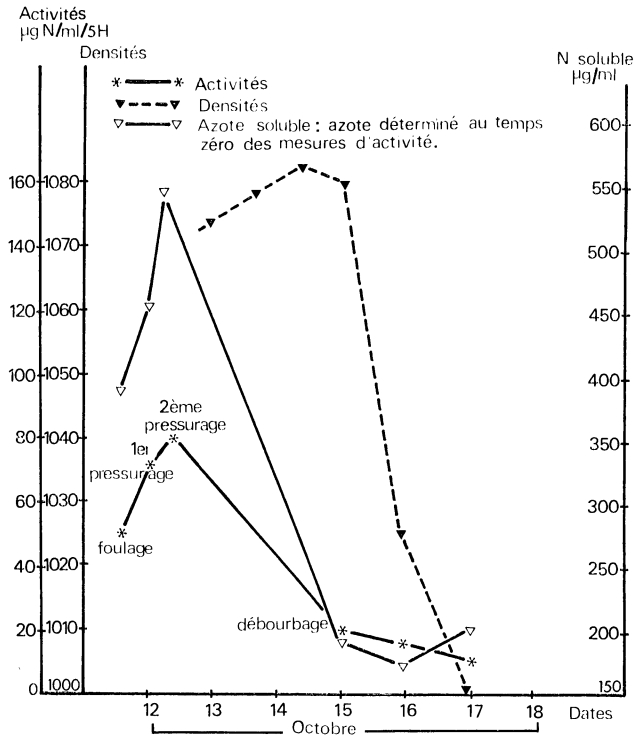


Fig. 2. — Evolution des activités protéolytiques du raisin (pH 2, 55 °C) au cours d'une vinification en blanc semi-industrielle.

2. Evolution des activités protéolytiques du moût de raisin au cours de la fermentation alcoolique par différentes souches de levures.

La mesure des activités effectuée à pH 3,7 et à 37 °C a pour but de mettre en évidence les protéases libérées dans le milieu au cours de la fermentation alcoolique par les levures.

La figure 3 compare l'évolution de ces activités dans le même jus de raisin mis en fermentation dans trois cuves différentes : la première ensemencée en *S. bayanus*, la seconde ensemencée en *S. cerevisiae* et la troisième non ensemencée (cuve témoin renfermant la seule flore indigène).

On observe une forte libération d'activité protéolytique dans le milieu vers une densité de 1,050 dans le cas d'un ensemencement en *S. bayanus*, alors que la même activité est libérée plus tard et en moins forte quantité dans le cas de la cuve témoin et de la cuve ensemencée en *S. cerevisiae*.

Cete remarque a pu être faite systématiquement pour les vinifications expérimentales et les microfermentations mises en place en 1977, en 1978 et en 1979.

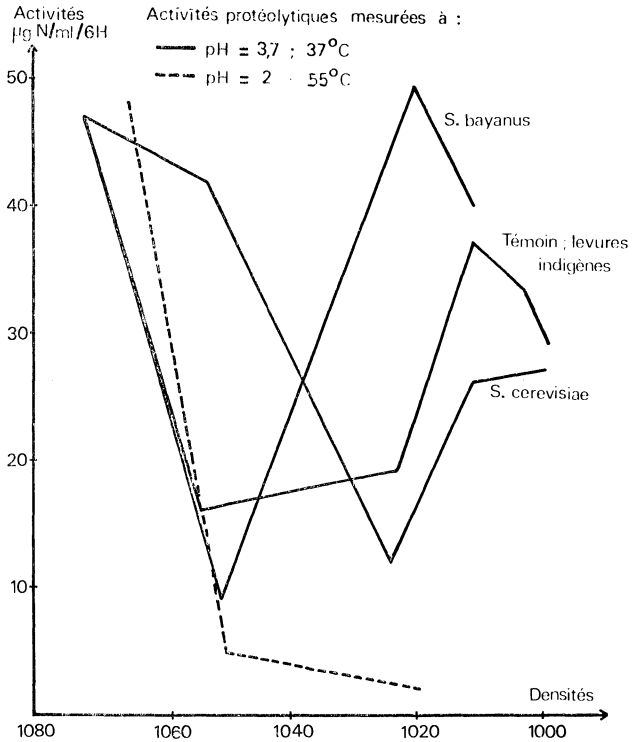


Fig. 3. — Evolution des activités protéolytiques d'un moût de raisin au cours de la fermentation alcoolique par différentes levures.

Dans cet essai qui rapporte une microfermentation de moût non débourbé, la diminution d'activité protéolytique du milieu observée en début de fermentation est due sans aucun doute à l'inhibition très rapide par l'alcool des protéases du raisin dont l'activité est dosée au moins en partie à pH 3,7 et à 37 °C. Cette inhibition des protéases du raisin est d'ailleurs bien mise en évidence par les mesures d'activité réalisées à pH 2 et à 55 °C.

Ainsi, les protéases exocellulaires des levures libérées dans le moût au cours de la fermentation alcoolique viennent en quelque sorte relayer les activités protéolytiques du raisin, mais l'espèce ou les souches de levures utilisées comme agents de la fermentation ont un caractère protéolytique plus ou moins prononcé.

Notons enfin que les activités protéolytiques libérées par les levures ont tendance à diminuer en fin de fermentation alcoolique.

3. **Evolution des activités protéolytiques d'un jus de raisin pasteurisé et d'un milieu synthétique au cours de la fermentation alcoolique par** *S. bayanus.*

L'intérêt de ces deux essais est d'éviter l'interférence en début de fermentation des protéases du raisin et des protéases exocellulaires des levures, puisque nous utilisons ici des milieux qui initialement ne renferment aucune activité protéolytique.

Dans le cas du jus de raisin pasteurisé, qu'il soit d'ailleurs enrichi ou non en phosphate biammoniacal, il n'y a pas de libération d'activité protéolytique dans le milieu par *S. bayanus* (tableau II), alors qu'au contraire dans le cas du même jus de raisin mélangé en parties égales avec du moût non pasteurisé mais débourbé, l'activité protéolytique augmente fortement dans le milieu vers une densité de 1,035 puis diminue en fin de fermentation alcoolique.

TABLEAU II

Evolution des activités protéolytiques (pH 3,7, 37 °C) d'un jus de raisin pasteurisé pur ou mélangé en parties égales avec du moût débourbé au cours de la fermentation alcoolique, par *S. bayanus*

Densités	Activités protéolytiques (µg N/ml/6 heures)	
	Jus de raisin pasteurisé pur	Jus de raisin mélangé à du moût débourbé (Vol/Vol)
1,053	0	8
1,035	—	113,7
1,032	0	—
1,016	0	—
1,000	—	93,6
0,999	—	79,7
0,997	0	—

Dans le cas de la fermentation dirigée sur milieu synthétique, une activité protéolytique importante apparaît rapidement dans le milieu pendant la phase de multiplication des levures appréciée par la mesure des densités optiques à 690 nm (fig. 4), et parallèlement à l'assimilation de l'azote soluble, c'est-à-dire de l'azote non précipitable au TCA. On peut observer que lorsque les levures sont en fin de phase d'assimilation azotée, l'activité protéolytique du milieu a tendance à diminuer mais qu'elle augmente de nouveau en fin de fermentation alcoolique et qu'il y a alors enrichissement du milieu en azote soluble.

4. **Action des protéases sur la composition azotée des vins.**

Indépendamment des phénomènes bien connus de remaniement des composés azotés dû à l'assimilation d'azote par les levures au cours de

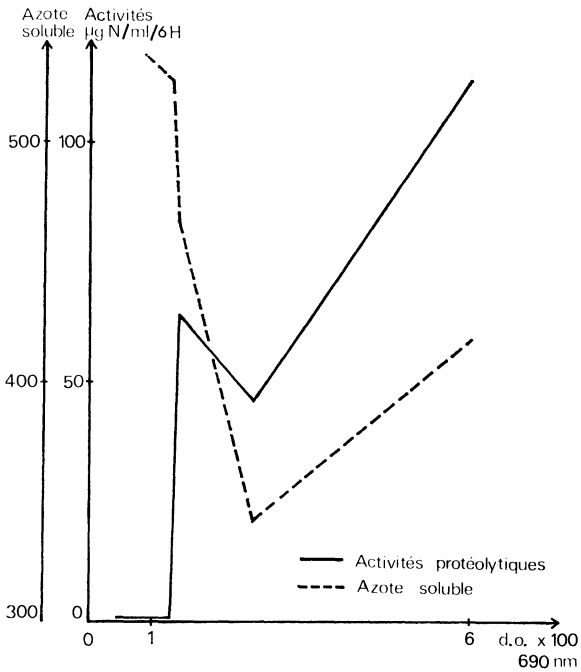


Fig. 4. — Evolution des activités protéolytiques (pH 3,7, 37 °C) et de l'azote soluble au cours de la fermentation dirigée d'un milieu synthétique par *S. bayanus*.

la fermentation alcoolique, puis à l'exsorption d'acides aminés par les cellules lorsque le milieu s'épuise en sucres (FEUILLAT, 1974), nous avons essayé de mettre en évidence l'influence des activités protéolytiques libérées dans le milieu sur le degré d'hydrolyse des substances azotées contenues dans les vins prélevés immédiatement en fin de fermentation alcoolique, et ceci en comparant un levurage avec *S. cerevisiae* et un levurage avec *S. bayanus*.

La figure 5 qui rapporte des chromatogrammes effectués sur colonne de Sephadex G 25 montre que les vins élaborés avec *S. bayanus* sont nettement plus protéolysés que les vins élaborés avec *S. cerevisiae*. En particulier un pic peptidique b' apparaît avec la première levure. Le tableau III confirme ces résultats sur le plan quantitatif. Les vins provenant d'une fermentation conduite avec *S. bayanus* sont plus riches en azote total et renferment en particulier plus de peptides d'un poids moléculaire inférieur à 5000 (fractions b et b') et plus d'acides aminés libres (fractions c et d) qui peuvent être considérés sans aucun doute comme des produits de dégradation des protéines du raisin.

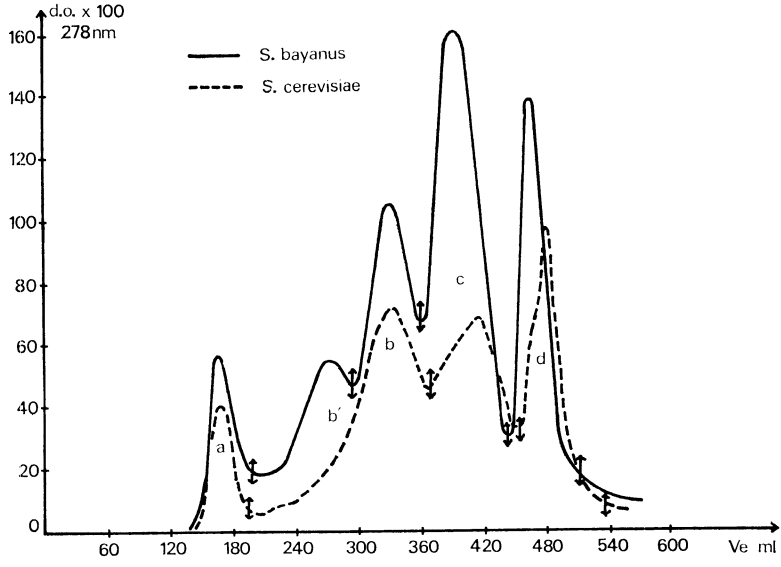


Fig. 5. — Chromatographie sur colonne de Sephadex G 25 de vins fermentés par *S. cerevisiae* et par *S. bayanus*.

Notons que ces résultats ont pu être confirmés à la fois en vinification semi-industrielle, en microvinification et en microfermentation, les jus non ensemencés et donc fermentant avec la seule flore indigène donnant d'ailleurs des vins ayant une teneur en azote total et un degré d'hydrolyse intermédiaires entre les vins fermentés par *S. bayanus* et les vins fermentés par *S. cerevisiae*.

TABLEAU III

Microdosages d'azote (mg/l et p. 100 de l'azote total) dans les principales fractions séparées par chromatographie des vins sur colonne de Sephadex G 25

Nature des vins	Fraction a PM ⩾ 5000 (Protéines et polypeptides)		Fractions b et b' (peptides)		Fraction c (Acides aminés libres)		Fraction d (Acides aminés libres)		Azote total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Témoin	68	9,5	435	60,	150	20,5	70	10	723
S. bayanus	75	9,5	485	61,5	159	20	70	9	789
S. cerevisiae	80	18,5	235	55	85	20	28	6,5	428

DISCUSSION

Comme l'avaient observé CORDONNIER et DUGAL (1968) l'activité protéolytique du raisin disparaît rapidement au cours de la fermentation alcoolique. Nous avons pu préciser que cette activité disparaît d'ailleurs presque en totalité au cours du débourbage en vinification en blanc, soit donc même avant le départ de la fermentation alcoolique.

Par contre de nouvelles activités protéolytiques peuvent être caractérisées dans le milieu à pH 3,7 et à 37 °C, pendant la fermentation alcoolique. Ces activités peuvent être considérées comme des protéases exocellulaires de levures, et elles sont d'ailleurs systématiquement plus importantes, dans le cadre de nos essais, avec la souche de *S. bayanus* essayée qu'avec la souche de *S. cerevisiae* ou qu'avec la flore indigène des moûts de raisin vinifiés.

Cette libération d'enzymes hydrolytiques exocellulaires par les levures est favorisée, d'après ABDOURAZAKOVA et *al.* (1975), lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs. Selon cette hypothèse, on peut supposer que *S. bayanus* a un caractère protéolytique plus prononcé que *S. cerevisiae* parce que c'est une levure de fin de fermentation. Même après un ensemencement tel que nous l'avons pratiqué dans un moût pasteurisé, *S. bayanus* ne se développe vraisemblablement que bien après *S. cerevisiae* qui peut rester la flore dominante pendant la plus grande partie de la fermentation.

Ainsi, des expériences inédites de SAPIS et DOMERCQ rapportées par RIBÉREAU-GAYON et *al.* (1976) montrent bien cette compétition entre les deux espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus,* la première se développant toujours beaucoup plus rapidement et beaucoup plus massivement que la seconde pour des taux d'ensemencement égaux.

Une autre remarque déjà faite par MADDOX et HOUGH (1969) semble être confirmée dans notre étude. La présence de protéines dans le milieu semble nécessaire pour induire la libération ou la biosynthèse des protéases exocellulaires des levures. Ainsi aucune activité protéolytique n'a pu être caractérisée pendant la fermentation d'un jus de raisin pasteurisé pur ne renfermant plus initialement de protéines qui avaient précipité à la chaleur, alors que cette activité réapparaît lorsqu'on enrichit le milieu avec du moût frais non pasteurisé contenant une partie des protéines du raisin. De même une activité est également mise en évidence dans la fermentation dirigée d'un milieu synthétique renfermant de l'autolysat de levures, donc des protéines ou des polypeptides.

La libération de protéases exocellulaires par les levures se traduit en fin de fermentation alcoolique par l'obtention de vins plus riches en azote total mais représenté principalement par des produits de dégradation des protéines (peptides, acides aminés), donc par des composés d'une bonne solubilité. Cette dernière observation laisse supposer un intérêt technolo-

gique de l'utilisation de levures à caractère protéolytique tant en ce qui concerne la stabilité protéique des vins élaborés qu'en ce qui concerne la fermentescibilité de ces mêmes vins vis-à-vis des bactéries lactiques. Ainsi FEUILLAT et *al.* (1977) ont pu mettre en évidence le rôle stimulant des peptides, et plus particulièrement des oligopeptides, sur la croissance de plusieurs espèces de bactéries intervenant dans la fermentation malolactique.

CONCLUSION

Parmi les enzymes étudiées en œnologie, les phénol-oxydases et les pectinases ont jusqu'alors retenu davantage l'attention que les protéases, parce que l'intervention de ces dernières est sans doute moins directement et moins immédiatement perceptible.

De plus CORDONNIER et DUGAL ayant montré dès 1968 la durée d'activité très limitée dans le temps des protéases du raisin, leur rôle, en dehors du cas particulier des vendanges chauffées, peut être considéré comme relativement secondaire.

Par contre, la production de protéases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique peut être une voie de recherche intéressante comme moyen d'enrichir le vin en azote soluble, et de contribuer ainsi à sa stabilité protéique et à sa fermentescibilité malolactique. La recherche de souches de levures à caractère protéolytique mériterait vraisemblablement d'être davantage prise en considération au niveau de la sélection des levures de vinification.

Sur un plan plus fondamental, il conviendrait d'isoler et de préciser la nature des protéases exocellulaires de levures mises en évidence dans cette étude et de rechercher si ces enzymes libérées dans le milieu préexistent au niveau de la paroi cellulaire ou si au contraire elles relèvent d'une biosynthèse lorsque le milieu devient carencé en éléments nutritifs.

Enfin, la préparation de ces protéases de levures pourrait être envisagée sur le plan technologique, notamment en fermentation dirigée, en vue de leur utilisation dans les moûts et les vins pour la dégradation enzymatique des protéines.

Manuscrit reçu le 18 janvier 1980.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mlle CHARPENTIER de l'Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation de l'Université de Dijon pour l'aide qu'elle nous a apportée dans la conduite des essais de fermentation dirigée.

RESUMÉ

La durée d'activité très limitée dans le temps des protéases du raisin est confirmée en vinification en blanc, mais une nouvelle activité protéolytique peut être caractérisée à 37 °C et à pH 3,7 dans le moût au cours de la fermentation alcoolique.

Cette activité doit être attribuée à des proétases exocellulaires libérées dans le milieu des levures. Parmi les souches essayées *S. bayanus* a une activité protéolytique plus importante que *S. cerevisiae,* ce qui se traduit par l'obtention de vins plus riches en azote soluble, donc plus stables du point de vue protéique et vraisemblablement d'une meilleure fermentescibilité malolactique.

SUMMARY

The short time of activity of grape proteolytic enzymes is confirmed in fermentation off skins. However, a new proteolytic activity has been characterized at 37 °C and at pH 3.7, occuring in alcoholic fermentation of the must.

This activity comes from exocellular proteolytic enzymes released by the yeasts in the medium. Among tested strains *S. bayanus* has a proteolytic activity greater than *S. cerevisiae*; so the soluble nitrogen content of wines is higher. According to this, proteolytic stability is better as, probably, malolactic fermentation capabilities.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Herstellung von Weisswein konnte man eine kurze proteolytische Aktivität von traubeneigenen Enzymen feststellen. Im gärenden Most konnte jedoch eine neue Proteasen-Aktivität charakterisiert werden und zwar bei 37 °C und einem pH-Wert von 3,7.

Diese Aktivität muss man exozellularen Proteasen zuschreiben, die von den Hefen freigesezt werden. Es hat sich gezeigt, dass *S. bayanus* eine grössere proteolytische Aktivität aufweist als *S. cerevisiae,* so dass man davon ausgehen kann, dass die mit S. b. vergorenen Weine reicher an löslichen. Eiweissstoffen sind und demzufolge « Eiweiss stabiler » sind und wahrscheinlich leichter die Apfelsäure abbauen.

RESUMEN

La duración de la actividad de las proteasas de la uva, muy limitada en el tiempo, se confirma en la vinificación en blanco, pero una nueva actividad proteolitica puede ser demostrada a 37 °C y pH 3,7 en el mosto en fermentación.

Esta actividad se debe atribuir a proteasas exocelulares liberadas por las levaduras. Entre las cepas ensayadas S. Bayanus tiene una actividad proteolitica más importante que S. Cerevisiae lo que se refleja en la obtención de vinos más ricos en nitrogeno soluble, por lo tanto más estables desde el punto de vista proteico y más favorables a la fermentación maloláctica.

RIASSUNTO

La durata d'attività molto limitata nel tempo delle proteasi dell'uva è confirmata nella vinificazione dei vini bianchi ma una nuova attività proteolitica puo esser caratterizzata a 30 °C ed a PH 3,7 nel mosto durante la fermentazione alcoolica.

Quest' attività deve esser attribuita a proteasi esocellulari liberate nel mezzo dei lieviti. Tra le specie utilizzate, *S. bayanus* ha un'attività protealitica piu importante che *S. cerevisiae,* ció che causa la realizzazione di vini piú ricchi in azoto solubile, dunque piú stabili dal punto di vista proteico, questi fanno probabilmente una migliore fermentazione malolattica.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDOURAZAKOVA S. Kh., SALOMOV Kh. T., FOMITCHEVA T.M. et IL'YASOV T.M.V., 1975 (en Russe). Etude de l'activité des enzymes dans le milieu à l'état de fermentation dans les conditions de la culture régulée des levures. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologuiya* (Bioch. microbiol. appliquées), **11**, n° 3, 341-345.

AHEHARN D., MEYERS S.P. et NICHOLS R.A., 1968. Extracellular proteinases of yeasts and yeastlike fungi. *Appl. Microbiol.*, **16**, 1370-1374.

BAGLIONI S., CASALE L. et TARANTOLA C., 1937. L'activita protéolitica del succo d'uva. *Problema alimentare*, **15**, (1), 1-17.

CANONICA B. et FERRARI G., 1978. Contribution à l'étude des activités protéolytiques des moûts, des vins et des levures. Mémoire de fin d'études, Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles, Dijon-Quetigny.

CORDONNIER R. et DUGAL 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**, 468, 139-145.

CHEN A.W.C. et MILLER J.J., 1968. Proteolytic activity of intact yeast cells during sporulation. *Can. J. Microbiol.*, **14**, 957-963.

FEUILLAT M. et BERGERET J., 1967. Influence des traitements thermiques de la vendange sur l'extraction des constituants azotés. *C.R. Acad. Sc.*, **264**, série D, 2520-2523.

FEUILLAT M., 1974. Contribution à l'étude des composés azotés du moût de raisin et du vin. *Thèse Doct. Sc.*, Université de Dijon.

FEUILLAT M., BIDAN P. et ROSIER Y., 1977. Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés de vin. *Ann. Technol. agric.*, 1977, **26**, N° 4, 435-447.

LENNEY J.F., 1956. A study af two yeast proteinases. *J. Biol. Chem.*, **221**, 919-930.

LENNEY J.F. et DALBEC J.M., 1967. Purification and properties of two proteinases from *Saccharomyces cerevisiae. Arch. Bioch. Bioph.*, **120**, 42-48.

LLAGUNO C., 1979. Equipement enzymatique des levures. Utilisation de nos connaissances pour la distinction des levures employées en œnologie. *Bull. O.I.V.*, **52**, N° 583, 716-732.

MADDOX I.S. et HOUGH J.S., 1969. Proteolytic enzymes and autolysing brewer's yeast. Proc European Brewery Convention. 12e Congrès EBC, Interlaken, 1969.

POUX C., 1974. Chauffage de la vendange et composés azotés. (1re partie) *Ind. Alim. Agric.*, **91**, n° 4, 335-340. (2e partie) — *Ind. Alim. Agric.*, **91**, n° 6, 695-699.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1976. *Sciences et techniques du Vin,* T. 3, 110, Dunod, Paris.

ROSE A.H. et HARRISON J.S., 1971. *The Yeasts,* vol. 2, 56, Academic Press, Londres et New-York.