Connaissance de la Vigne et du Vin,
Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1989, **23,** N° 1, 7-23.

RECHERCHE D'UN MATÉRIEL ENZYMATIQUE ADAPTÉ A L'HYDROLYSE DES PRÉCURSEURS D'ARÔME DE NATURE GLYCOSIDIQUE DU RAISIN

R.E. CORDONNIER, Y.Z. GÜNATA, R.L. BAUMES, et C.L. BAYONOVE

Laboratoire des Arômes et Substances Naturelles, IPV - INRA
2, place Viala, 34060 Montpellier Cedex, (France).

Résumé : *34 préparations enzymatiques commerciales de spécifications variées ont été étudiées : 5 d'entre elles, les plus efficaces pour hydrolyser les glycosides naturels du raisin, ont été retenues pour des études complémentaires. Ces préparations donnent des proportions relatives en différents terpénols variables à partir d'un même extrait glycosidique naturel : ainsi, certaines préparations libèrent principalement du linalol, d'autres du géraniol. Elles présentent toutes des activités β-D-glucopyranosidase, α-L-rhamnopyranosidase et α-L-arabinofuranosidase : leur inhibition par le glucose et l'éthanol varient selon la préparation. C'est l'hémicellulase REG2 qui présente les activités glycosidases les plus importantes, avec une grande résistance thermique et une activité intéressante au pH des moûts et des vins. De plus, elle présente une activité α-L-arabinopyranosidase douée d'une remarquable résistance en milieu acide*

INTRODUCTION

Il existe dans le raisin une part d'arôme sous forme liée, de nature glycosidique et de structure bien établie chez le Muscat et le Riesling (CORDONNIER et BAYONOVE, 1974 ; DI STEFANO, 1982 ; WILLIAMS et *al.*, 1982 ; GÜNATA et *al.*, 1988). Ces précurseurs, glycosides terpéniques, sont dans la plupart des cépages, beaucoup plus abondants que la part d'arôme libre correspondant aux terpénols (DIMITRIADIS et *al.*, 1984 ; GÜNATA et *al.*, 1985). On sait que les terpénols jouent un rôle important dans la typicité des Muscats (STEVENS et *al.*, 1966 ; RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975 ; BOIDRON et TORRES, 1982). Dans certaines conditions les glycosides terpéniques sont hydrolysables par des préparations enzymatiques commerciales (GÜNATA, 1984 ; WILSON et *al.*, 1984) libérant les terpénols odorants qui ont un seuil de perception olfactif bas (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975).

Cependant, si la libération par voie enzymatique de l'arôme lié du raisin est possible, la maîtrise de cette libération, pour une exploitation de tout le potentiel aromatique du raisin, suppose que les enzymes responsables soient identifiées et leur mécanisme d'action précisé. Ce préalable est également indispensable pour la production d'enzymes performantes qui pour l'instant ne sont que des impuretés présentes dans des préparations commerciales utilisées à d'autres fins.

Le travail réalisé constitue une première approche afin de répondre à ces objectifs. Dans la partie décrite ici nous avons cherché à sélectionner parmi les préparations enzymatiques commerciales testées, celles qui étaient les plus capables d'hydrolyser les glycosides terpéniques naturels isolés du Muscat, pris comme modèle, en libérant des terpénols, c'est-à-dire celles qui renferment en principe l'équipement enzymatique convenable.

Ce premier point étant acquis, nous avons fait l'inventaire des activités glycosidases des préparations retenues de façon à choisir parmi elles les plus aptes à nous servir de matériel d'étude du mécanisme de révélation des arômes et, ultérieurement, de production d'enzyme.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES

Naringinase (SIGMA), β-glucosidase d'amande douce (KOCHLIGHT), préparations commerciales de spécifications variées (cellulase, hémicellulase, pentosanase, pectinases, enzymes de macération, lipase, protéase,...) ont été utilisées. Parmi elles, différents pectinols, Rohament CW, Rohament CA, Rohament CT, Veron HE, Corolase S50, β-glucanase 1 sont fournis par ROHM; Hemicellulase REG2, Cellulase AC 4000, Pectinase 263, Rapidase C80P, Protéase AP 292 sont fournis par GIST BROCADES; Pektolase 3PA et PA sont fournis par GRINDSTED; Pectinex Ultra SP, Pectinex 3 XL, Celluclast, Gamanase sont fournis par NOVO; Ultrazym 100 est fourni par CIBA-GEIGY; cellulase 50000, Tannase S, Tannase B1RB, Lipase 80000, Esterase 20000, Protéase V200 et B500 sont fournis par RAPIDASE. La β-glucanase 2 d'origine fongique a été préparée dans notre laboratoire.

Ces préparations sont utilisées directement dissoutes dans le tampon 0,1 M de mesure des activités glycosidases.

II — SUBSTRATS

a) Substrats synthétiques chromogènes

p-nitrophényl-(*p*NP)-β-D-glucopyranoside, *p*NP-α-L-rhamnopyranoside, *p*NP-6-0-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranoside (*p*NP-β-rutinoside), *p*NP-α-L-arabinopyranoside sont fournis par SARSYNTHESE, *p*NP-α-L-arabinofuranoside par SIGMA.

Ces substrats ont été choisis en tenant compte de la structure des glycosides terpéniques identifiés dans le raisin comme étant des terpényl-β-rutinosides et des terpényl-6-0-α-L-arabinofuranosyl-β-D-glucopyranosides (WILLLIAMS et *al.,* 1982) et en faisant l'hypothèse que ces glycosides pouvaient être hydrolysés, au moins pour partie par des glycosidases à activité α-L-rhamnopyranosidase (EC 3.2.1.40), α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) et β-D-glucopyranosidase (EC 3.2.1.21).

b) Glycosides extraits de raisin

Ceux-ci ont été isolés de jus ou de marc de Muscat de Frontignan ou d'Alexandrie selon une méthode déjà décrite (GÜNATA et *al.,* 1985) par fixation sur résine XAD_2 à

partir soit directement du jus, soit d'extrait dans un tampon pour les matières végétales solides, élution par du pentane pour éliminer les composés volatiles libres puis élution par l'acétate d'éthyle pour récupérer les glycosides. L'éluat d'acétate d'éthyle est concentré et repris dans le tampon citrate-phosphate, 0,1 M, pH 4,4. Cet extrait est ensuite débarrassé des traces de terpénols libres par lavage au pentane.

III — APPRÉCIATION DES ACTIVITÉS DES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES COMMERCIALES

Les préparations d'enzyme ont été testées au double point de vue de leur aptitude à hydrolyser les extraits glycosidiques naturels du raisin puis de leurs activités glycosidases vis-à-vis de substrats synthétiques chromogènes.

a) *Mesure de l'hydrolyse sur les extraits glycosidiques de Muscat*

Elle a été réalisée selon une méthode déjà décrite et choisie pour avoir des conditions de pH et de température optimum des activités glycosidases (GÜNATA et *al.*, 1985). Le mélange réactionnel 0,1 M en tampon citrate-phosphate pH 4,4 contenant l'extrait glycosidique de raisin et la quantité convenable de préparation commerciale d'enzyme préalablement dissoute dans le même tampon, est laissé à incuber à 40° C pendant 12 heures. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions mais en présence d'enzyme inactivée (95° C, 30 mn). Le milieu d'incubation est ensuite extrait par du pentane et l'extrait pentanique analysé par chromatographie en phase gazeuse. Les données sont exprimées en microgrammes de composés volatils par litre de jus ou par kilogramme de matériel végétal frais. Les analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées en utilisant le logiciel LEAS (Biométrie, INRA).

b) Mesure des activités glycosidases

Le mélange réactionnel comprend 0,1 ml d'une solution (17 mM) de substrat chromogène dans un tampon acétate, 0,1 M, pH 4,4 et 0,3 ml de préparation enzymatique à la dilution convenable dans le même tampon. Le glucose ou l'éthanol ont été ajoutés dans le milieu réactionnel à une concentration finale respectivement de 15 p. 1000 et 10 p. 100 dans le cas de l'étude de leurs effets sur les activités glycosidases. A différents temps d'incubation (40° C) 0,2 ml de mélange réactionnel sont prélevés et la réaction enzymatique est stoppée par addition de 0,1 ml de Na_2CO_3 0,2 M. L'intensité de la coloration jaune que développe le sel de sodium du *p*-nitrophénol est alors mesurée à 400 nm. Les activités sont exprimées en μmoles de *p*-nitrophénol libérées en 60 minutes par mg de préparation enzymatique.

c) pH optimal des activités glycosidases

Une solution d'Hemicellulase REG2 est incubée (40° C) en présence du substrat chromogène dans du tampon universel, type Britton et Robinson, (BRUNEL, 1948) de pH variant de 2 à 7. Les mesures d'activité sont réalisées aux divers pH d'incubation dans les conditions décrites précédemment.

TABLEAU I

Monoterpénols libérés par l'hydrolyse d'extrait glycosidique de marc de raisin (Muscat de Frontignan) par les préparations enzymatiques commerciales

[Activités exprimées par rapport à celles du Pectinol VR(1)].

Constituants révélés / Enzymes	Linalol	α-terpinéol	citronellol	nérol	géraniol	somme des terpénols
Pectinol VR(1)	100	100	100	100	100	100
Rohament CW	581	714	73	103	103	214
Hemicellulase REG2	527	145	85	150	146	191
Cellulase AC4000	302	157	13	108	98	124
Pectinase 263	456	133	12	137	131	169
Pektolase 3PA	130	117	158	101	111	112
Pectinol VR(2)	17	92	—	13	31	25
β-glucosidase d'amande douce	23	73	12	16	27	25
Naringinase	41	86	50	7	8	14
Pectinol super VR	18	106	42	10	18	20
Pectinol B1	13	84	30	8	16	16
Pectinol B20	25	81	22	11	17	19
Pectinol D5S	19	80	—	16	41	23
Pektolase PA	52	108	85	58	85	69
Pectinex ultra SP	19	125	57	4	6	53
Pectinex 3XL	25	75	—	20	38	57
Ultrazym 100	94	95	54	52	70	73
Rapidase C80P	28	71	14	16	30	57
Cellulase 50000	40	125	106	10	23	76
Celluclast	50	112	93	15	35	70
Rohament CA	55	89	17	11	14	39
Rohament CT	102	98	48	47	51	66
Veron HE	59	86	22	13	18	44
β-glucanase 1	110	103	38	40	48	89
β-glucanase 2	25	89	45	4	5	58
Tannase S	15	95	16	2	3	14
Tannase B1 RB	30	105	87	7	10	68
Gamanase	41	125	39	43	67	80
Lipase 80000	23	81	16	1	2	22
Estérase 20000	18	78	21	1	2	25
Corolase S50	21	85	49	4	5	60
Protéase AP 292	63	99	51	51	64	24
Protéase V200	29	88	—	4	5	22
Protéase B500	30	100	—	2	3	15

d) Stabilité thermique des activités glycosidases

Une solution d'Hémicellulase REG2 dans du tampon universel est chauffée à 60° C aux pH 2, 3, 4, 5, 6 et 7 pendant 50 mn, puis refroidie dans un bain de glace. Les activités glycosidases sont mesurées à pH 4 et 40° C avant et après traitement. L'appareil de traitement thermique est celui décrit par ailleurs (CORDONNIER et *al.*, 1975).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I — INVENTAIRE DES PRÉPARATIONS COMMERCIALES

Le tableau I donne les aptitudes de 34 préparations enzymatiques à la libération des principaux monoterpénols à partir d'extraits glycosidiques du marc de Muscat de Frontignan. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de quantité de terpénols libérés par chaque enzyme par rapport aux quantités libérées par le Pectinol VR(1). Celui-ci a été choisi comme enzyme de référence dans chaque série de mesure pour effacer les différences possibles entre les extraits glycosidiques.

On constate que sur les 34 préparations étudiées, cinq se sont révélées supérieures au Pectinol VR(1). Parmi elles, certaines affichent des activités hémicellulase, glucanase ou pectinolytique mais d'autres préparations affichant ces mêmes types d'activité se sont montrées inefficaces; parmi elles : Pectinol Super VR, B1, B20, D5S, Pektolase PA, Pectinex, Ultrazym 100, Rapidase, Celluclast, Rohament CT, CA et Veron H.E. L'efficacité de ces cinq préparations est donc reliée à des activités indépendantes de l'une ou l'autre de leur spécification d'origine. De plus cette efficacité est aléatoire. C'est ainsi que deux lots de Pectinol VR [notés VR(1) et VR(2)] ont donné des résultats tout-à-fait différents, VR(2) ne présentant que 25 p. 100 des activités de VR (1). Ce caractère est important à souligner car il montre les incertitudes quant à l'efficacité des préparations pourtant identifiées une première fois comme efficaces et la nécessité de bien cibler, dans les préparations, les activités responsables de leur performance.

Il est intéressant aussi de souligner l'inefficacité de préparations à spécification bien déterminée telles que les lipases, estérases, ce qui paraît donc exclure la présence dans les extraits glycosidiques de terpénols liés à des lipides ainsi que cela a été signalé dans les pétales de rose (DUNPHY et ALLCOCK, 1971). C'est le cas aussi de la naringinase et de la β-glucosidase d'amande douce présentant des spécifications glycosidases.

Parmi les préparations les plus actives, trois se distinguent pour leur aptitude particulière à libérer à la fois le plus de terpénols totaux et le plus de linalol; il s'agit de Rohament CW, Hemicellulase REG2 et Pectinase 263. Au contraire deux se distinguent pour leur faible aptitude à libérer le linalol. Il s'agit de Pectinol et de Pektolase 3 PA. Ces cinq enzymes ont été retenues pour poursuivre plus en avant notre sélection.

III — ÉTUDE DES ACTIVITÉS DES PRÉPARATIONS COMMERCIALES

Les cinq préparations enzymatiques sélectionnées précédemment ont été testées vis-à-vis d'une part de la libération de terpénols à partir d'extraits glycosidiques de Muscat d'Alexandrie et d'autre part de l'hydrolyse de substrats synthétiques chromogènes.

TABLEAU II

Monoterpénols libérés par hydrolyse d'extraits glycosidiques de Muscat d'Alexandrie par les cinq préparations enzymatiques commerciales.

(Résultats exprimés en μg de terpénol libéré par litre de jus ou par kg de marc).

Composés	Origine de l'extrait glyco-sidique	Préparations enzymatiques				
		Rohament CW	Pectinase 263	Hemicellu-lase REG2	Pektolase 3PA	Pectinol VR(1)
Linalol	jus	900	730	778	382	258
	marc	889	503	827	199	122
α-terpinéol	jus	31	9	12	14	6
	marc	75	20	30	21	12
Citronellol	jus	13	18	15	16	19
	marc	34	42	50	43	39
Nérol	jus	124	192	123	190	193
	marc	224	234	251	261	192
Géraniol	jus	369	441	418	474	506
	marc	779	824	904	944	771
LOF trans[1]	jus	73	29	37	12	7
	marc	80	24	36	8	6
LOF cis[2]	jus	14	8	7	8	6
	marc	22	16	15	5	9
Hotriénol	jus	4	6	4	6	3
	marc	—	10	12	4	—
Diol[3]	jus	44	44	51	21	42
	marc	55	61	78	57	61
Somme des terpénols	jus	1 572	1 477	1 445	1 123	1 040
	marc	2 158	1 734	2 203	1 542	1 211

1 : Linalol oxyde, forme furannique trans; 2 : Linalol oxyde, forme furannique cis;
3 : Diméthyl-3,7-dihydroxy-3,7-octadiene-1,5.

Par ailleurs, la naringinase et la β-glucosidase d'amande douce ont été également testées vis-à-vis des substrats synthétiques chromogènes pour comprendre les raisons de leur inefficacité vis-à-vis des substrats naturels.

a) Hydrolyse des extraits glycosidiques naturels

Afin de mieux évaluer les activités des cinq préparations retenues nous avons également dosé quelques oxydes et diols terpéniques libérés à la fois à partir d'extraits glycosidiques de jus et de marc de Muscat d'Alexandrie (tableau II).

Du point de vue de la quantité totale de terpénols libérés, trois préparations enzymatiques présentent à peu près les mêmes performances quel que soit le substrat glycosidique, jus ou marc. Ce sont Rohament CW, Pectinase 263 et Hemicellulase REG2; viennent ensuite, non significativement différentes, Pektolase 3 PA et Pectinol VR (1).

Afin d'illustrer et de simplifier l'exploitation des résultats obtenus en ce qui concerne les terpénols pris individuellement, nous avons effectué 2 ACP, l'une sur les jus, l'autre sur les marcs, en utilisant dans les deux cas des variables réduites.

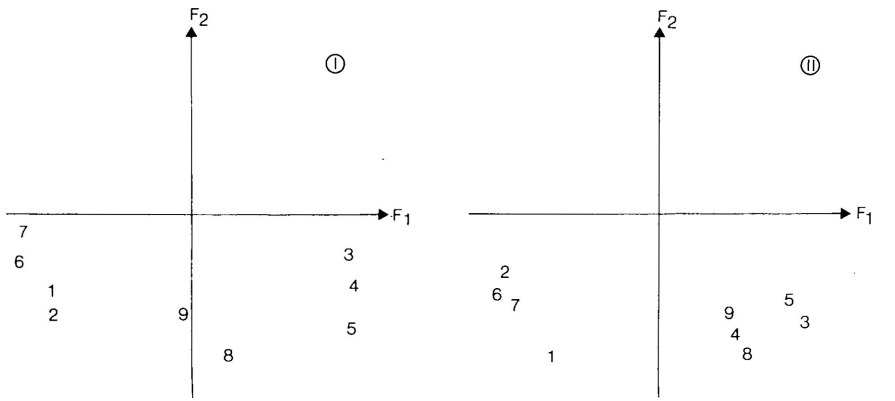


Fig. 1. — Analyse en composantes principales (ACP) dans le cas du jus (I) du marc (II).
Cercle des corrélations des terpénols (1-9)[a] dans le plan des deux premières composantes principales.

[a] 1 : linalol; 2 : α-terpinéol; 3 : citronellol; 4 : nérol; 5 : géraniol; 6 : LOF trans[1]; 7 : LOF cis[2]; 8 : hotriénol; 9 : diol[3]
1, 2, 3 : voir le tableau II

Les résultats obtenus montrent une grande analogie entre jus et marc : dans les deux cas, les deux premières composantes principales représentent environ 75 p. 100 de la variance totale (74 p. 100 pour les jus, 77 p. 100 pour les marcs). De plus, les cercles des corrélations dans le plan des deux premières composantes principales (figure 1) montrent une corrélation faible ou légèrement négative entre deux groupes de variables fortement corrélées : linalol, ses oxydes furanniques et α-terpinéol d'une part, géraniol, nérol et citronellol d'autre part. Par contre, le hotriénol et le diméthyl-3,7-dihydroxy-3,7-octadiene-1,5, corrélés positivement au deuxième groupe dans le cas du marc apparaissent plus indépendants dans le cas du jus.

TABLEAU III

Activités glycosidases des préparations enzymatiques commerciales.

(Exprimées en μmoles de *p*-nitrophénol libéré après 60 mn d'incubation à 40°C, pH 4,4 et par mg de préparation enzymatique).

Enzymes	Substrat				
	*p*NP-α-L-rhamnopyranoside	*p*NP-α-L-arabinofuranoside	*p*NP-α-L-arabinopyranoside	*p*NP-β-D-glucopyranoside	*p*NP-β-rutinoside
Pectinol VR (1)	1,4	7,5	2,0	51,1	1,0
Pektolase 3PA	0,8	56,0	8,8	25,1	0,6
Pectinase 263	3,5	9,2	5,5	117,2	4,5
Rohament CW	4,6	4,0	4,5	52,7	3,5
Hemicellulase REG2	11,3	81,0	3,9	107,2	11,0
Naringinase	540	0,003	0,12	0,30	0,2
β-glucosidase d'amande douce	0,004	0,20	37,0	961	0,8
Naringinase + β-glucosidase d'amande douce					18,0

Les projections communes sur les deux premières composantes principales et axes principaux (figure 2) mettent en évidence dans les deux cas (jus et marc) les rôles prédominants joués dans la discrimination des préparations enzymatiques, par chacun des deux groupes précédents, d'une part par le linalol, d'autre part par le géraniol et le nérol. Ces trois composés étant en outre parmi les plus importants pour l'arôme du Muscat (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975; BOIDRON et TORRES, 1982), ces résultats mettent en évidence le rôle conséquent que peut avoir une préparation enzymatique donnée sur l'arôme libéré. Ces différences sont illustrées par les diagrammes de la figure 3 montrant les différents profils obtenus après hydrolyse des extraits glycosidiques par les 5 préparations commerciales en ne retenant que ces trois composés. Trois préparations enzymatiques se distinguent par leur aptitude particulière à libérer le linalol. Ce sont Rohament CW, Hemicellulase REG2 et Pectinase 263 qui libèrent 3 à 6 fois plus de linalol que Pektolase 3PA et Pectinol VR(1) alors que l'aptitude à libérer le géraniol et le nérol est légèrement plus importante pour ces deux dernières préparations sauf pour le Pectinol VR(1) dans le cas des marcs.

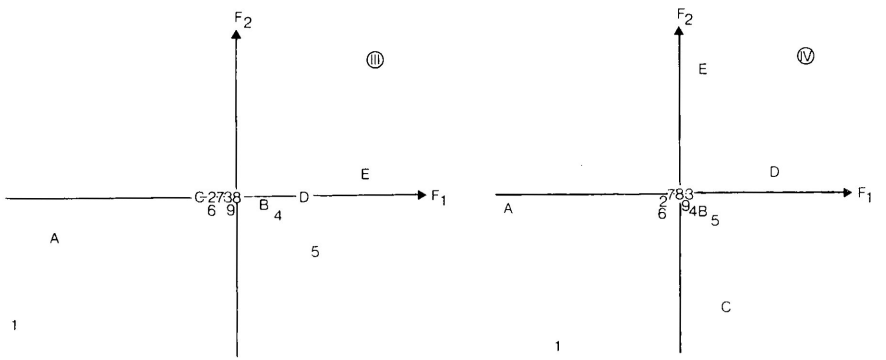


Fig. 2. — ACP dans le cas du jus (III) et du marc (IV). Projections des préparations enzymatiques commerciales (A-E)[b] et des terpénols (1-9)[a] sur les deux premiers axes et composantes principales.

[a] Voir figure 1; [b] A = Rohament CW; B = Pectinase 263; C = Hemicellulase REG2; D = Pektolase 3PA; E = Pectinol VR(1).

b) Hydrolyse des substrats synthétiques chromogènes

Le tableau III donne un inventaire des activités glycosidases des préparations sélectionnées.

Ces préparations actives sur les substrats naturels ont aussi des activités α-L-rhamnopyranosidase, α-L-arabinofuranosidase et β-D-glucopyranosidase. Il n'en est pas de même de la naringinase et de la β-glucosidase d'amande douce auxquelles manquent, ou sont en quantité insuffisante, pour la première l'activité β-D-glucopyranosidase, pour la seconde l'activité α-L-rhamnopyranosidase. Quant à l'activité α-L-arabinofuranosidase, elle est très faible dans ces deux préparations. Tout se passe donc comme si l'aptitude des préparations à l'hydrolyse des substrats naturels était liée à la présence simultanée de ces trois types d'activités, ce qui serait effectivement le cas si l'hydrolyse des extraits glycosidiques du raisin faisait intervenir l'action

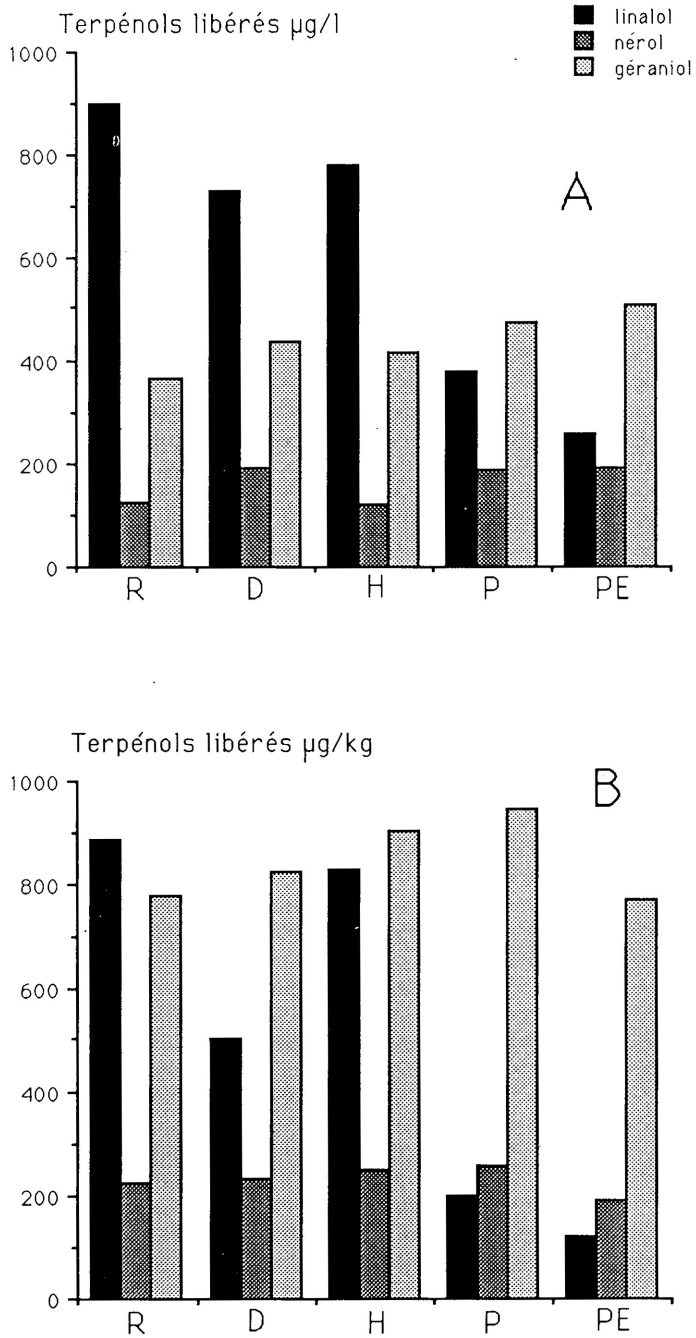


Fig. 3. — Profils de linalol, nérol et géraniol libérés par hydrolyse d'extrait glycosidique du jus (A) et du marc (B) de Muscat d'Alexandrie par diverses préparations enzymatiques commerciales[a].

[a] R = Rohament CW; D = Pectinase 263; H = Hemicellulase REG2; P = Pektolase 3PA; PE = Pektinol VR(1).

conjuguée de deux enzymes selon un mécanisme séquentiel dans lequel serait impliqué une α-L-rhamnopyranosidase et (ou) une α-L-arabinofuranosidase puis une β-D-glucopyranosidase. C'est bien ce qui se passe, comme nous avons pu le démontrer par la suite (GÜNATA et *al.*, 1988).

La présence d'activités de ce type dans des préparations d'origine fongique a souvent été signalée : une β-D-glucopyranosidase y est souvent présente (WOODWARD et WISEMAN, 1982), une α-L-rhamnopyranosidase a été isolée et purifiée à partir de cultures d'*Aspergillus niger* (ONO, 1980), une α-L-arabinofuranosidase à partir des cultures d'*Aspergillus niger* (WAIBEL et *al.*, 1980) et de celles de *Dichomitus squalens* (BRILLOUET et MOULIN, 1985).

Les cinq préparations ont aussi des activités vis-à-vis du *p*NB-β-rutinoside de niveaux très différents ; les plus riches en cette activité sont aussi les plus riches en activité, α-L-rhamnopyranosidase et les plus aptes à libérer les terpénols. Mais il n'est pas possible de savoir si ces activités sont le résultat de l'action directe, sur la liaison glucosidique, d'une glycosidase de type rutinase (HAY et *al.*, 1961), rhamnodiastase ou hétéroglycosidase (BOURBOUZE et *al.*, 1974) à spécificité large s'étendant à des aglycones et des glycosides variés ou de l'action conjuguée d'une α-L-rhamnopyranosidase et d'une β-D-glucopyranosidase, que l'on trouve par exemple dans le complexe enzymatique de la naringinase, et que nous avons pu séparer au laboratoire (GÜNATA et *al.*, 1988). Cette deuxième hypothèse a été vérifiée dans le cas de la préparation de la naringinase dont nous disposions puisque son activité vis-à-vis du *p*NP-β-rutinoside passe de 0,2 à 18 après ajout de β-glucosidase, comme le montrent les résultats du tableau III.

Mentionnons enfin la présence dans toutes les préparations d'activités α-L-arabinopyranosidases dans des proportions toujours plus faibles que les activités α-L-arabinofuranosidases et en proportions très différentes suivant les préparations, ce qui laisse supposer que deux enzymes différentes sont responsables de ces activités. Les activités α-L-arabinopyranosidases n'interviennent sans doute pas dans l'hydrolyse des glycosides terpéniques dont la structure furannique est bien établie dans le cas du Muscat et du Riesling (WILLIAMS et *al.*, 1982), mais il était intéressant de les signaler étant donné le peu d'informations que nous avons sur ce type d'activité (SCHWABE et *al.*, 1978).

En définitive, il ressort de ce bilan des activités glycosidases des préparations étudiées que l'Hemicellulase REG2 est celle qui semble renfermer l'équipement enzymatique le plus adéquat, puisqu'elle est à la fois une des plus aptes à libérer le plus de terpénols, et la plus riche en activités α-L-rhamnopyranosidase, α-L-arabinofuranosidase et aussi très riche en activité β-D-glucopyranosidase. Ce pourrait être en tout cas une source intéressante d'α-L-arabinofuranosidase, comme d'ailleurs la naringinase une source d'α-L-rhamnopyranosidase.

Cependant, sur un plan théorique il serait intéressant de comparer l'équipement glycosidasique de l'Hemicellulase REG2 à celui, par exemple, de Pektolase 3PA ou Pectinol VR(1) dont les performances dans la libération du linalol sont si différentes.

TABLEAU IV

Effet du glucose 15 p. 1000 et de l'éthanol 10 p. 100 sur les activités glycosidases des préparations enzymatiques commerciales.

(Résultats exprimés en activités relatives par rapport au témoin).

Enzyme	Effecteur : Glucose 15 p. 1000					Effecteur : Éthanol 10 p. 100				
	Substrat					Substrat				
	*p*NP-α-L-rhamnopyranoside	*p*-NP-α-L-arabino		*p*NP-β-D-glucopyranoside	*p*NP-β-rutinoside	*p*NP-α-L-rhamnopyranoside	*p*NP-αL-arabino-		*p*NP-β-D-glucopyranoside	*p*NP-β-rutinoside
		pyranoside	furanoside				pyranoside	furanoside		
Pectinol VR(1)	91,3	84,0	83,0	31,0	7,5	59,1	95,6	87,0	121,0	34,5
Pektolase 3PA	100,0	88,0	95,0	38,3	11,1	53,7	93,7	98,2	120,0	30,0
Pectinase 263	73,0	84,1	96,0	22,5	13,0	76,8	93,5	96,3	105,0	42,1
Rohament CW	61,0	84,2	81,0	23,7	9,0	79,3	96,5	89,6	117,5	41,9
Hemicellulase REG2	88,0	88,2	97,0	20,5	10,2	78,7	66,8	86,0	108,2	46,6

c) *Effet du glucose et de l'éthanol sur les activités glycosidases des préparations enzymatiques.*

Les propriétés retenues sont parmi celles qui intéressent le plus la technologie des jus de fruits et boissons fermentées à savoir l'effet du glucose et de l'éthanol.

Les résultats rassemblés dans le tableau IV montrent ces effets aux concentrations de 15 p. 1000 pour le glucose et 10 p. 100 pour l'éthanol.

Le glucose est un fort inhibiteur de l'activité β-D-glucopyranosidase et de l'hydrolyse du *p*NP-β-rutinoside et par contre pratiquement sans effet sur les activités α-L-rhamnopyranosidase et α-L-arabinofuranosidase. Cela montre bien le caractère général de l'inhibition par le glucose des β-D-glucopyranosidases, plus particulièrement d'origine fongique comme cela a été déjà démontré (WOODWARD et WISEMAN, 1982; KITPREECHAVANICH et *al.*, 1986; YEOH et *al.*, 1986). La forte inhibition de l'activité β-D-glucopyranosidase par le glucose à une concentration aussi faible que 15 p. 1000 montre la limite de l'utilisation de ces préparations pour l'hydrolyse enzymatique des glycosides terpéniques par voie enzymatique séquentielle, notamment dans le moût, et la nécessité de s'orienter vers d'autres sources pour la sélection d'une β-D-glucopyranosidase à la fois non ou peu inhibée par le glucose et apte à hydrolyser ces précurseurs d'arôme.

L'éthanol exalte légèrement les activités β-D-glucopyranosidases. Cette augmentation est peut-être due à une activité glucosyl transférase de l'enzyme (VAHERI et *al.*, 1979). Il est par contre fortement inhibiteur de l'hydrolyse du *p*NP-β-rutinoside et plus légèrement des activités α-L-rhamnopyranosidase et α-L-arabinofuranosidase.

Ce comportement différent des activités glycosidases de ces préparations commerciales vis-à-vis de ces deux effecteurs apporte une preuve de la pluralité des systèmes enzymatiques concernés par les activités présentes dans ces préparations.

III — ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS DES ACTIVITÉS GLYCOSIDASES DE L'HEMICELLULASE REG2

a) *Effet du pH*

La figure 4 montre les effets du pH sur les activités glycosidases de l'Hémicellulase REG2.

C'est aux pH 4 et 5 que se situe l'optimum pour les activités α-L-arabinofuranosidase d'une part et α-L-rhamnopyranosidase et β-D-glucopyranosidase d'autre part; l'activité β-D-glucopyranosidase se distingue des deux autres par une chute importante d'activité dans la zone d'acidité inférieure au pH optimal. C'est justement dans cette zone que se situent les pH des moûts et des vins. Ainsi, à pH 3,5 l'activité β-D-glucopyranosidase ne représente plus que 35 p. 100 de sa valeur maximale alors qu'à ce pH les activités α-L-arabinofuranosidase et α-L-rhamnopyranosidase gardent encore 95 et 70 p. 100 de leur activité maximale.

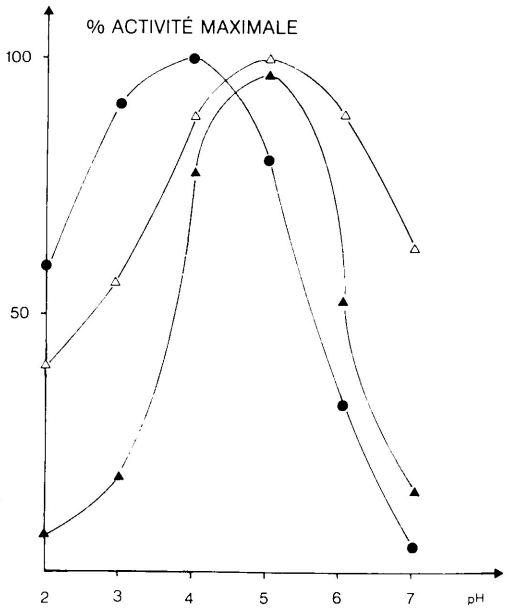


Fig. 4. — Effet du pH sur les activités α-L-arabinofuranosidase (●—●), α-L-rhamnopyranosidase (Δ—Δ) et β-D-glucopyranosidase (▲—▲) de l'Hemicellulase REG2.

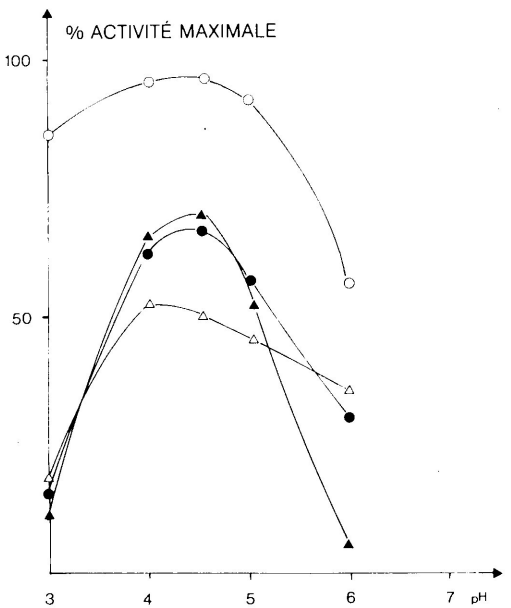


Fig. 5. — Stabilité thermique (60° C, 50 mn) en fonction du pH des activités α-L-arabinofuranosidase (●—●), α-L-arabinopyranosidase (○—○), α-L-rhamnopyranosidase (Δ—Δ) et β-glucopyranosidase (▲—▲) de l'Hemicellulase REG2.

b) *Stabilité thermique*

Elle a été étudiée à différents pH et à 60° C pendant 50 minutes. La figure 5 montre l'effet du pH sur la stabilité thermique des différentes activités.

Toutes les activités glycosidases ont une stabilité maximale aux environs de pH 4,5 et toutes sont très résistantes à la chaleur puisqu'après 50 minutes de chauffage à 60° C à pH 4,5 elles conservent encore au minimum 50 p. 100 de leur valeur initiale et à pH 3,5, encore plus de 40 p. 100 environ.

L'action de la chaleur ne permet pas de différencier les activités α-L-arabinofuranosidase et α-L-rhamnopyranosidase au contraire de l'activité β-D-glucoyranosidase qui se distingue par une très grande instabilité thermique au-delà du pH 5,0. Les mêmes résultats ont été observés dans le cas de l'équipement enzymatique de la naringinase (KAMIYA et *al.*, 1967).

L'activité α-L-arabinopyranosidase se distingue des autres activités glycosidases et en particulier de l'activité α-L-arabinofuranosidase par son acidorésistance remarquable : ainsi à pH 3, après 50 minutes à 60° C, elle conserve encore 80 p. 100 de sa valeur contre seulement 15 p. 100 pour l'activité α-L-arabinofuranosidase. L'Hemicellulase REG2 possède donc un équipement arabinosidase complexe renfermant au moins une α-L-arabinofuranosidase et une α-L-arabinopyranosidase.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de comparer différentes préparations enzymatiques commerciales vis-à-vis de leur aptitude à hydrolyser les glycosides terpéniques extraits du raisin de Muscat. On observe une grande variabilité dans cette aptitude selon la préparation. Parmi elles cinq présentent de plus fortes activités glycosidases et leur efficacité hydrolytique semble liée à la présence simultanée d'une α-L-arabinofuranosidase, α-L-rhamnopyranosidase et β-D-glucopyranosidase, cette dernière étant dans tous les cas très inhibée par le glucose.

Remerciements

Nous remercions C. BIRON, R. RATIER et D. MASCRÉ pour leur aide et leur collaboration technique.

Manuscrit reçu le 24 janvier 1989; accepté pour publication le 28 février 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOIDRON J.M. et TORRES P., 1982. Étude et recherche d'un indicateur aromatique des VDN Muscats. *Bulletin Technique des P.O.*, N° 105, 107-112.

BOURBOUZE R., PRATVIEL-SOSA F. et PERCHERON F., 1974. Purification, propriétés et spécificité d'une hétéroglycosidase des graines de sarrazin. *Biochimie,* **56,** 1305-1313.

BRILLOUET J.M. et MOULIN J.O., 1985. Production, purification and properties of an α-L-arabinofuranosidase from *Dichomitus squalens. Carbohydr. Res.,* **144,** 113-126.

BRUNEL A., 1948. Traité pratique de chimie végétale. *Ed : Section technique d'agriculture tropicale. Tourcoing,* **I,** 328.

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

CORDONNIER R., BIRON C. et DUGAL A., 1975. Les invertases du raisin et de *Saccharomyces cerevisiae.* Leur participation respective à l'hydrolyse du saccharose ajouté à la vinification. *Ann. Technol. Agric.,* **24,** N° 2, 171-192.

DI STÉFANO R., 1982. Presenza di precursori del linalolo nel moscato bianco del Piemonte. *Vignevini,* **IX,** N° 7, 45-47.

DIMITRIADIS E. et WILLIAMS P., 1984. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.,* **35,** N° 2, 66-71.

DUNPHY P.J. et ALLCOCK C., 1971. Plant Lipid Biochemistry. *Ed. Hitchcock C., Nichols BW. Academic Press. London and New York, 53.*

GÜNATA Z., 1984. Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin. Importance des terpénylglycosides, action des glycosidases. *Thèse Doc. Sci., Université de Montpellier, France.*

GÜNATA Y.Z. BAYONOVE C.L. BAUMES R.L. et CORDONNIER R.E., 1985. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.,* **331,** 83-90.

GÜNATA, Y.Z., BITTEUR S., BRILLOUET J.M., BAYONOVE C. et CORDONNIER R., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grapes. *Carbohydr. Res.,* **184,** 139-149.

HAY G.W., WESTLAKE W.S. et SIMPSON F.G., 1961. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus.* Purification and characterization of rutinase. *Can. J. Microbiol.,* **7,** 921-932.

KAMIYA S., ESAKI S. et HAMA M., 1967. Glycosides and oligosaccharides in the L-rhamnose series. Part 1. Enzymatic partial hydrolysis of flavonoid-glycosides. *Agr. Biol. Chem.,* **31,** N° 2, 133-136.

KITPREECHAVANICH V., HAYASHI M. et NAGAI S., 1986. Purification and characterization of extracellular β-xylosidase and β-glucosidase from *Aspergillus fumigatus. Agric. Biol. Chem.,* **50,** N° 7, 1703-1711.

ONO M., 1980. Inhibitory effects of citric acid in enzymic debittering of citrus fruit juice. *J. Ferment. Technol.,* **58,** N° 4, 387-389.

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

SCHWABE K., GROSSMANN A.M., FEHRMANN B., et TSCHIERSCH B., 1978. Inhibition of α-L-arabinofuranosidase (*Aspergillus niger)* and non inhibition of α-L-arabinopyranosidase (almond emulsin and barley) by L-arabino-1,4 lactone. *Carbohydr. Res.*, **67,** 541-544.

STEVENS K.L., BOMRBEN J. et Mc FADDEN W.H., 1966. Volatiles from grapes Muscat of Alexandria. *J. Agric. Food Chem.*, **14,** N° 3, 244-252.

VAHERI M., LEISOLA M. et KAUPINEN N., 1979. Transglucosylation products of cellulase system of *Trichoderma reesei. Biotechnol. Lett.,* 1, 41-46.

WAIBEL R., AMADO R. et NEUKOUM H., 1980. Purification of an α-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* by substrate affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, **197,** 86-91.

WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R. WILSON B. et MASSY-WESTROPP R.A., 1982. Novel monoterpene disaccharide glycoside of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry,* **21,** N° 8, 2013-2020.

WILSON B., STRAUSS C.R. et WILLIAMS P.J., 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developping Muscat. *J. Agric. Food Chem.,* **32,** 919-924.

WOODWARD J. et WISEMAN A., 1982. Fungal and other β-D-glucosidases, their properties and applications. *Enzymes Microb. Technol.,* **4,** 73-79.

YEOH H.H., TAN T.K. et KOH S.K., 1986. Kinetic properties of β-glucosidase from *Aspergillus ornatus. Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **25,** 22-28.