INSTITUT FRANÇAIS
DE LA VIGNE ET DU VIN

ITINÉRAIRES
N° 26

Enzymes en œnologie :

Fabrication, réglementation, applications

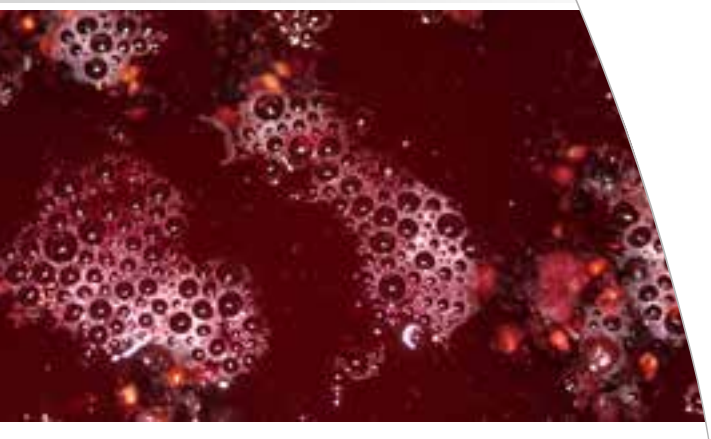
IFV
TERROIR
D'INNOVATION

INTRODUCTION

Le Cahier Itinéraires sur les enzymes en œnologie est réalisé dans le but d'apporter des éléments de compréhension et/ou d'information sur la nature des préparations enzymatiques, leur fabrication, leur composition, leur intérêt en œnologie et leurs applications dans les opérations pré et post-fermentaires.

Ce Cahier peut paraître dense, mais sa structuration autour de 4 grands chapitres permet aux lecteurs (producteurs, techniciens, institutionnels,…) de trouver aisément l'information recherchée.

Il est important de préciser en préambule que l'ensemble de ces travaux a débuté, il y a 12 ans, avec pour but de clarifier la composition des préparations enzymatiques et leurs actions sur les raisins, moûts ou vins. Le contexte réglementaire au travers de l'OIV et les références techniques ayant beaucoup évolué, c'est l'état actuel des connaissances qui vous est présenté ici.



Sommaire

Introduction 2

Sommaire 3

Chapitre 1 : Les enzymes et leur production 4

Chapitre 2 : Le rôle des enzymes en œnologie 8

Chapitre 3 : La réglementation des enzymes 16

Chapitre 4 : La mise en œuvre des préparations enzymatiques dans l'élaboration du vin 19

Conclusion 29

Remerciements 32

Chapitre 1

Les enzymes et leur production

Qu'est-ce qu'une enzyme ?

Une enzyme est une protéine, un catalyseur biologique, qui accélère des réactions biochimiques dans les conditions de températures et de milieux biologiques. En présence de son substrat, en concentration suffisante et dans des conditions physicochimiques adéquates (pH, T°), l'enzyme convertit ce substrat, pour former un (des) produit(s).
La spécificité des enzymes est généralement comparée à celle d'une clef qui n'ouvre qu'une seule porte. Chaque enzyme est spécifique d'un type de réaction (hydrolyse, décarboxylation, oxydation) ainsi que d'un substrat particulier (stéréochimie, conformation spatiale,..). Ainsi, l'enzyme est liée au substrat dans une combinaison appelée "complexe enzyme-substrat" (voir figure n°1) : elle est alors capable de catalyser la réaction, par exemple de couper en deux produits le substrat, avant de s'en séparer.

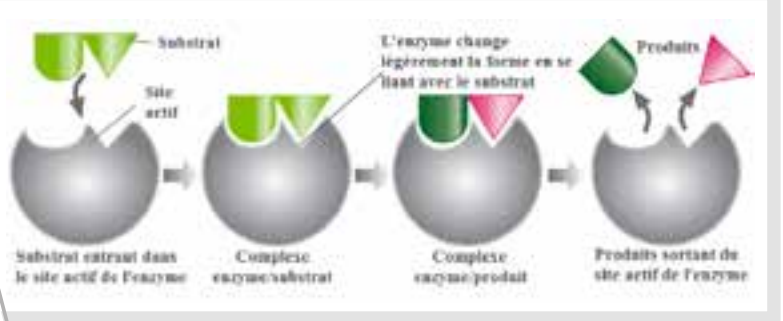


Figure 1 : Schéma simplifié du mécanisme d'action des enzymes

La production des enzymes industrielles

Si les enzymes sont présentes dans tous les organismes vivants, ce sont des bactéries et des champignons microscopiques qui sont les sources exploitables d'enzymes pour les industriels. Ces microorganismes sont prélevés dans des milieux naturels divers (les forêts, la montagne, les fjords,…). Chaque producteur d'enzymes détient ses souches. Les enzymes d'intérêt œnologique sont issues principalement de microorganismes appartenant aux espèces *Aspergillus* et *Trichoderma*. Au sein de chacune de ces espèces existe un grand nombre de souches qui présentent autant d'aptitudes différentes de production d'enzymes. Il existe par exemple près de 10.000 souches connues d'*Aspergillus niger*.
La première étape dans la production d'enzymes est l'identification de l'espèce et de la souche la plus adaptée pour un objectif technologique recherché.

Cette recherche du microorganisme le plus adéquat passe par 3 technologies :

- L'optimisation de souches sélectionnées passant par le contrôle des conditions de fermentation.
- L'amélioration de souches par mutagénèse (mutation de gènes provoquée par certaines conditions), qui permet par exemple d'augmenter la productivité.
- Le génie génétique qui consiste à introduire dans un microorganisme le gène codant pour la production d'une enzyme d'intérêt industriel. Cette voie n'est pas retenue à l'heure actuelle pour les applications en œnologie.

Comment savoir si des enzymes sont issues d'un organisme génétiquement modifié ?

L'OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) prévoit que le fabricant d'enzymes ait l'obligation d'informer ses clients si l'enzyme fournie a été produite par un microorganisme génétiquement modifié. Selon la résolution OIV-OENO 485-2012, cette information doit être fournie sur l'étiquette ou sur la documentation liée au produit.

Le procédé de production industrielle suit ensuite quatre grandes étapes (figure 2)

Figure 2 : Grandes étapes de fabrication des préparations commerciales

Etape 1 : la fermentation

Les enzymes sont produites par le microorganisme lorsqu'il est mis en conditions de fermentation. Les microorganismes sont mis en culture, dans un substrat liquide (fermentation immergée) ou sur un substrat solide (fermentation en milieu solide ou en surface). Les conditions de température, d'hygrométrie, de pH et de nutrition (facteurs de croissance) sont primordiales pour conduire la fermentation vers la formation des enzymes désirées. Chaque fabricant d'enzymes a développé un savoir-faire propre sur le contrôle des facteurs externes qui conditionnent la qualité finale des enzymes produites. La source de nutrition que l'on appelle le "substrat" relève également du savoir-faire du fabricant. Le substrat apporte les sources de carbone, d'azote, de vitamines et de minéraux nécessaires à la production d'enzyme. La recette du substrat est propre à chaque souche.

Etape 2 : la séparation

Les enzymes produites sont séparées du microorganisme de production, en général par floculation et filtration. Le liquide obtenu contenant les enzymes est ensuite soumis à des étapes de filtration.

Etape 3 : la concentration et la purification

Le liquide clarifié contenant les enzymes doit être concentré pour proposer un produit suffisamment actif. Cette concentration se fait à l'aide de technologies membranaires et/ou par évaporation. A ce stade, si nécessaire, le producteur procède à une étape de purification.

Etape 4 : la formulation

A l'issue de la phase de concentration, le producteur peut formuler, c'est-à-dire mettre le concentré enzymatique sous une forme stockable, commercialisable et adaptée à son utilisation industrielle. Lors de cette étape, le producteur peut aussi procéder au mélange d'enzymes de différentes fermentations. Les enzymes sont proposées soit sous forme de granulés soit sous forme liquide : la solution concentrée passe dans un procédé de séchage et de granulation ou est conditionnée directement après stabilisation (enzymes sous forme liquide).

Le procédé de granulation nécessite l'emploi d'un support inerte qui permettra d'assurer la stabilité de l'enzyme. Les supports généralement utilisés pour les préparations enzymatiques destinées au vin sont par exemple la maltodextrine et le citrate de sodium.
Les formulations liquides sont stabilisées pour éviter le développement de contaminations microbiologiques et assurer la stabilité des activités enzymatiques. Le chlorure de potassium (KCl), le glycérol et le sulfate d'ammonium sont les substances privilégiées pour les enzymes œnologiques de par leur efficacité et leur compatibilité avec les composés du vin.

A savoir

La quantité de glycérol apportée par les préparations liquides en contenant est de l'ordre de 200 fois inférieures aux teneurs de glycérol produites par les levures lors de la fermentation alcoolique et n'a aucun impact gustatif sur le vin à ces doses.

Quelle est la différence entre les préparations liquides et les préparations granulées ?

Les préparations enzymatiques liquides doivent être stockées à basse température (idéalement à 4°C) pour maintenir leur activité et utilisées dans les 24 mois de leur fabrication. Elles peuvent être introduites directement sur vendange foulée ou dans le moût ou dans le vin. Les préparations granulées peuvent être stockées dans leur emballage d'origine jusqu'à 4 ans après leur date de fabrication et doivent être réhydratées avant utilisation.

La formulation des préparations enzymatiques pour l'œnologie

Les parois des cellules végétales composant le raisin ont une structure complexe. Pour répondre à cette complexité, les préparations enzymatiques destinées à un usage œnologique contiennent souvent plusieurs enzymes agissant en synergie. Ainsi les enzymes dites **pectolytiques** destinées à dégrader les substances pectiques du raisin, sont toujours un mélange des activités pectine lyase (PL), pectine méthylesterase (PME) et polygalacturonase (PG). Ces activités sont produites simultanément par les microorganismes et reproduisent l'action des enzymes endogènes du raisin (à l'exception de la pectine-lyase). Les connaissances approfondies des mécanismes qui interviennent dans le raisin et sa transformation en vin, même si elles sont incomplètes, sont essentielles pour la formulation spécifique des enzymes à usage œnologique.

L'élimination de l'activité **cinnamoyl estérase** par un procédé de purification de certaines préparations enzymatiques œnologiques, provient ainsi de la meilleure compréhension du processus de formation des acides phénols libres et des phénols volatils dans les années 90. A la suite de la découverte de ces mécanismes de transformation des acides phénols en éthyls phénols et en vinyls phénols, les fabricants d'enzymes œnologiques ont développé des formulations enzymatiques à faible activité cinnamoyl estérase (FCE : Free from Cinnamoyl Esterase). La cinnamoyl estérase (CE) est une activité naturellement produite en plus ou moins grande quantité selon les souches de microorganismes produisant des pectinases. Elle favorise la formation de substrats des phénols volatils responsables de déviations aromatiques ; en blanc : goût de médicament et en rouge, en cas de contamination par *Brettanomyces*, arômes reconnus de sueur de cheval et d'écurie.

L'élimination de cette activité par purification nécessite un traitement physique complexe pouvant aller jusqu'à plusieurs jours. Elle consiste en l'élimination simultanée (jamais totale) de la **cinnamoyl estérase** et des **anthocyanases (betaglucosidase)** néfastes pour la couleur du vin (en particulier des rouges). Cette étape de purification entraîne généralement une perte d'activité de l'ordre de 30% qui sera prise en compte dans la concentration finale du produit.

Qu'est-ce qu'un formulateur de préparations enzymatiques ?

Le formulateur d'enzymes pour l'œnologie achète à un fabricant d'enzymes (disposant de la technologie de fermentation) des préparations liquides concentrées ou des préparations granulées de différents types d'activités d'intérêt pour l'œnologie. L'assemblage final des préparations enzymatiques correspond à un effet œnologique souhaité et au savoir-faire du formulateur.

Chapitre 2

Le rôle des enzymes en œnologie

Il est important de préciser que ce chapitre traite essentiellement les enzymes intervenant dans la dégradation de la paroi des cellules végétales. Dans les processus de transformation du raisin en vin (fermentation alcoolique (FA), fermentation malolactique (FML),...) de nombreuses activités sont également mises en jeu mais ne sont pas décrites ici.

Les activités enzymatiques présentes dans le raisin et le vin

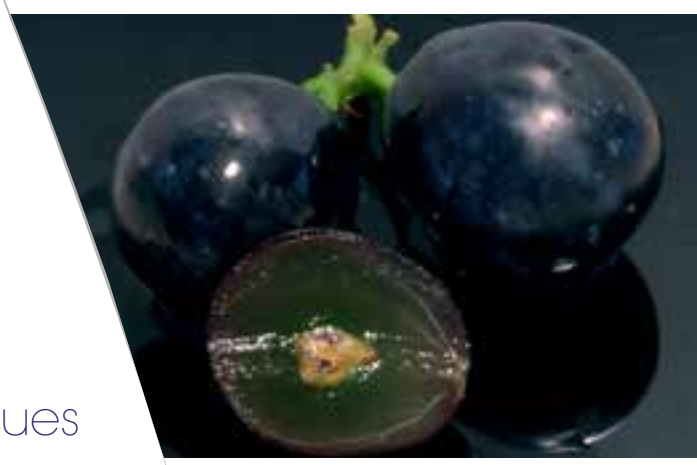
La **baie de raisin** contient deux des trois principales enzymes pectolytiques utilisées en œnologie : une pectine-méthyl-estérase (PME) **[R1 ; R2]** et une endo-polygalacturonase (endo-PG) **[R1]**, bien que l'activité de cette dernière soit faible.

La **pectine-méthyl-estérase** (PME) est essentiellement localisée dans la pellicule de la baie. La pulpe en contient 2 à 3 fois moins et elle est quasiment absente des pépins. L'activité de la PME varie d'un cépage à l'autre et augmente avec la maturité du fruit **[R3]**.

La **polygalacturonase** (PG) favorise la maturité physiologique des parois cellulaires du raisin. Elle travaille de concert avec la PME en agissant sur les molécules issues de l'hydrolyse provoquée par celle-ci. Les activités liées de PME et de PG décroissent en fin de maturation et tolèrent mal les conditions de vinification (alcool, pH,…).

A ces enzymes pectolytiques, s'ajoutent majoritairement des activités **glycosidases**. La plus importante est la β-D-glucosidase, mais, on retrouve également des α-L-arabinofuranosidases et α-L-rhamnosidases. Leur synthèse augmente également avec la maturité du fruit **[R4]**. Toutefois, la β-D-glucosidase de raisin est faiblement active au pH du moût et est inhibée par le glucose **[R5]**.
En 1999 et en 2001, une équipe de chercheurs français et une équipe de chercheurs australiens se sont intéressés respectivement aux activités enzymatiques susceptibles de participer aux modifications de la paroi cellulaire au cours du développement de la baie de raisin (*Vitis vinifera L.*). Ils ont répertorié l'activité pectine-méthyl-estérase et ont également mis en évidence d'autres activités intéressantes en œnologie comme la β-galactosidase mais n'ont trouvé aucune trace de galactanase, de cellulase ou de xylanase **[R6 ; R7]**.
Enfin, en cas d'attaque fongique, la vigne produit également des **β-D-glucanases [R5]**.
Les enzymes ne proviennent pas seulement de la baie de raisin elle-même. Elles sont également synthétisées **par des levures et autres microorganismes endogènes**. Parmi ces levures, ce sont les genres non tolérants à l'alcool qui sont prédominants (*Hanseniaspora*, *Kloeckera* et *Candida*) et non *Saccharomyces cerevisiae*. Elles sécrètent notamment des glycosidases, cellulases, estérases … dans leur espace périplasmique comme dans le milieu. Et contrairement aux glycosidases de la baie, celles produites par les levures ne sont pas inhibées par le glucose **[R8]**.
Botrytis Cinerea, responsable de la pourriture noble du raisin produit une pectine-méthyl-estérase très active, de même que des polygalacturonases **[R3]**.

Peu d'enzymes contenues dans les préparations industrielles sont absentes du raisin, de la levure ou même de la flore d'altération, à l'exception de certaines glycosidases comme l'apiosidase. Pour autant, l'emploi des préparations commerciales se justifie car les enzymes naturellement présentes (raisins et/ou microorganismes épiphytes) ne sont ni en concentration suffisante, ni assez actives dans les conditions de vinification pour aboutir aux résultats escomptés (clarification, pressurage,..). Ces enzymes naturellement présentes (raisins et/ou flore épiphyte) tolèrent mal les basses températures, le pH du moût (2,8-3,8) et sont inhibées notamment par des teneurs élevées en glucose, SO_2, tannins des vins rouges et alcool **[R9]**.



Les principales activités enzymatiques contenues dans les préparations enzymatiques utilisées en œnologie

La liste des enzymes ici présentée n'est pas exhaustive, mais correspond aux activités enzymatiques les plus connues.

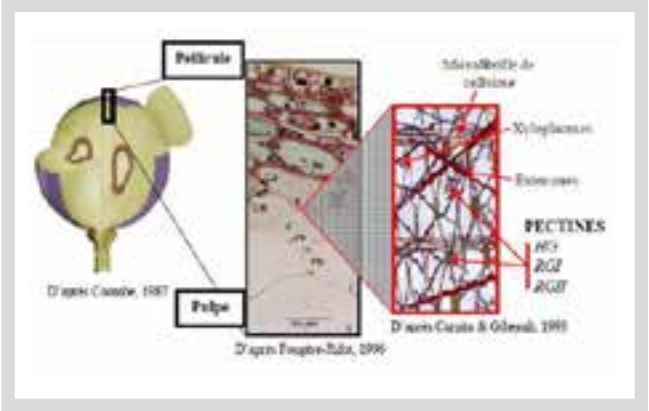


Figure 3 : Coupe d'une baie et organisation tissulaire [R10; R11; R12]

Enzymes pectolytiques

Les enzymes pectolytiques sont susceptibles de dégrader les polysaccharides pectiques constituant la paroi des cellules végétales. Elles incluent donc les enzymes qui dégradent les homogalacturonanes, mais aussi l'ensemble des enzymes assurant la dégradation des autres constituants des pectines que sont les rhamnogalacturonanes-I et leurs chaînes latérales (galactanes, arabinanes, et arabinogalactanes) (figure 3).

> Pectine-méthyl-estérase (PME) (figure 4)

Les pectines-méthyl-estérases sont capables de libérer du méthanol et de l'acide polygalacturonique des molécules de pectine. Elles présentent une forte affinité pour les esters méthyliques de l'acide polygalacturonique. Le pH optimal d'activité se situe entre 3,5 et 4,5 pour les enzymes fongiques et est compris entre 7 et 9 pour les enzymes végétales. La température optimale d'activité est proche de 37°C [R13].

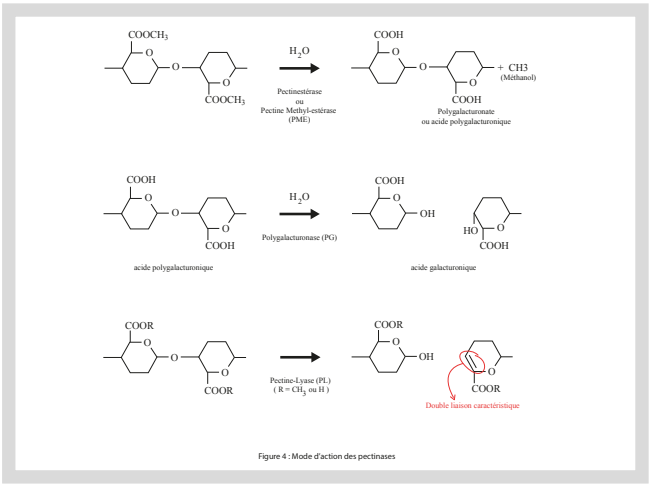


Figure 4 : Mode d'action des pectinases

> Polygalacturonases (PG) (figure 4)

Ce sont des enzymes qui catalysent la coupure des liaisons reliant les molécules d'acide galacturonique. Il en existe différentes de différents modes d'action (endo et exo) :

- Les exo-polygalacturonases agissent de façon récurrente à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne. Le produit de la réaction est soit de l'acide galacturonique, soit de l'acide digalacturonique. Ayant des affinités vis à vis des pectines non méthylées, elles sont par ailleurs bloquées par la présence de rhamnose ou de chaînes latérales. Elles sont surtout isolées à partir de fruits et de légumes et ont un pH optimal situé entre 4,5 et 5,5.
- Les produits de réaction des endopolygalacturonases sont le mono-, di-, et le trimère de l'acide galacturonique. Le rendement de la réaction est très dépendant du degré de méthylation et au-delà de 75% d'estérification par le méthanol, les pectines ne sont plus hydrolysées par la seule action de la PG.

La PG a besoin de l'intervention préalable de la PME qui, de par son action, diminuera le degré de méthylation [R14].

> Endo pectine lyases (PL) (figure 4)

Il s'agit d'enzymes ayant un mode d'action particulier puisqu'elles catalysent le clivage des liaisons glycosidiques. Cette réaction entraîne la formation d'une double liaison. Le pH optimum est compris entre 5 et 5,5 chez les champignons.

A l'inverse de celle des PG, leur affinité augmente avec le degré de méthylation de la pectine.

> Galactanases

Les galactanases sont aussi variées que leurs substrats sont divers (galactanes, arabinogalactanes de type I et II). Leur pH optimal d'activité est proche de 4 et la température optimale de 40°C pour les galactanases d'origines fongiques.

Enzymes hémicellulolytiques ou hémicellulases

Les hémicelluloses sont une classe de polysaccharides très variée, tant au niveau des oses constitutifs qu'au niveau des ramifications. Des xyloglucanes, des xylanes et des arabinoglucuronoxylanes ont été décrits dans la constitution polysaccharidique des parois des cellules du raisin **[R15]**.

> Xylanases

Ces enzymes hydrolysent la liaison qui existe au sein des xylanes plus ou moins substitués (arabinoxylanes, arabinoglucuronoxylanes,..). Aux vues de la nature des substituants des xylanes, leur dégradation complète nécessite la contribution d'autres enzymes qui agissent en synergie avec les xylanases.

Il existe deux familles principales de xylanases :

- **Les exo-xylanases** qui produisent principalement du D-xylose à partir des extrémités non réductrices des xylanes.
- **Les endo-xylanases** qui produisent du xylose et du xylobiose en agissant au hasard à l'intérieur des chaînes.

Les complexes xylanolytiques sont sécrétés par de nombreux champignons, par des bactéries, mais aussi par des levures. Les xylanases issues des champignons ont un pH optimal d'action compris entre 4 et 5 et une température optimale comprise entre 40 et 60°C **[R15 ; R16]**

Enzymes cellulolytiques ou cellulases [R13] (figure 5)

Ces enzymes permettent la dégradation de la cellulose. Sa dégradation est assurée par un complexe enzymatique [R17] formé de :

- **Les endo-glucanases** qui catalysent l'hydrolyse de façon aléatoire des liaisons osidiques au sein de la cellulose. Elles participent également à la dégradation des xyloglucanes qui appartiennent au groupe des hémicelluloses.
- **Les exo-glucanases**, qui libèrent respectivement du cellobiose et du glucose. Elles interviennent en relais sur les fragments obtenus par action des endo-glucanases
- **la β-glucosidase** qui dégrade le cellobiose en glucose. Cette enzyme participe également à la libération des précurseurs d'arômes.

De par la structure cristalline de la cellulose, sa dégradation par les enzymes demeure limitée.

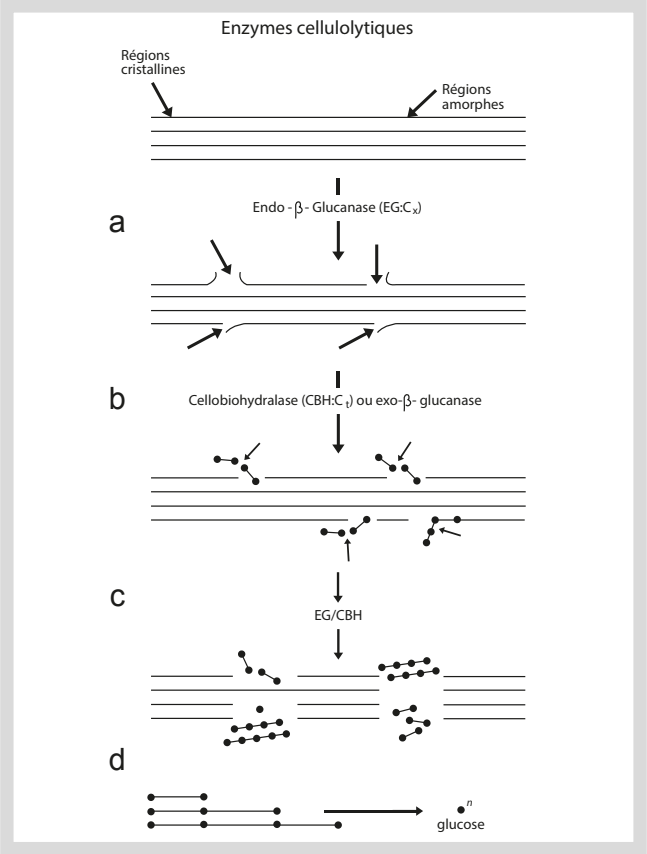


Figure 5 : Représentation schématique de l'action synergique (a, b, c, d) des enzymes lors de la cellulolyse

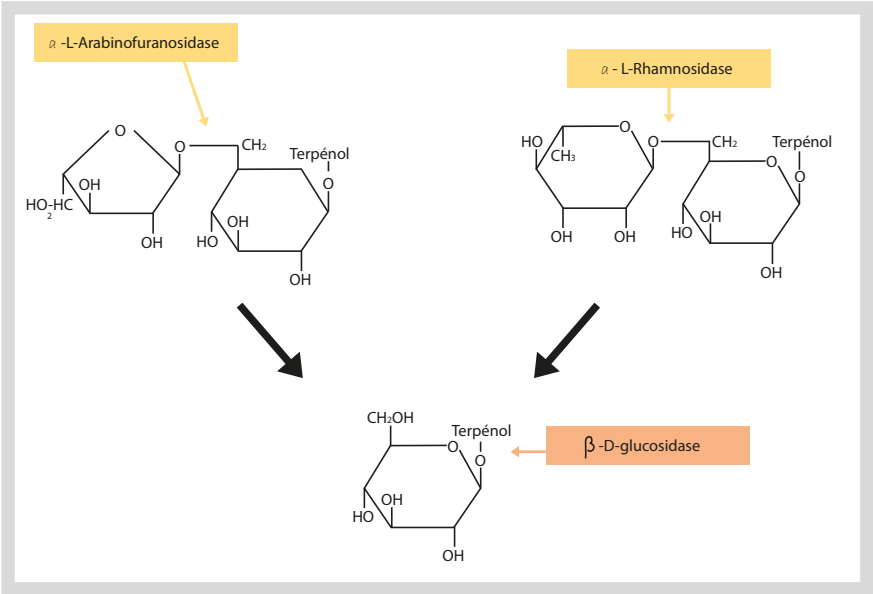


Figure 6 : Mécanisme de libération des monoterpénols à partir de leurs précurseurs glycosidiques.

Glycosidases

Dans le raisin, on retrouve des terpénols liés à des diglycosides [R18]. La libération des terpénols fait intervenir un complexe enzymatique [R19]. L'arôme variétal caractérise le cépage et est de ce fait un élément prépondérant du profil aromatique, de la typicité et, par conséquent, de la qualité des vins. Certains composés aromatiques se trouvent à la fois sous forme libre et liée à des résidus glucidiques. Les arômes libres peuvent être détectés par voie olfactive alors que la forme liée est inodore. Dans la baie de raisin, la fraction combinée est prépondérante par rapport à la forme libre. De ce fait, en libérant la forme liée il est possible d'augmenter le potentiel aromatique des vins.

> α-L-arabinofuranosidase (figure 6)

Elle catalyse l'hydrolyse de la liaison interosidique des précurseurs arabinofuranosyl-glucosides des composés d'arômes.

> α-L-rhamnosidase (figure 6)

Elle permet l'hydrolyse séquentielle des précurseurs rhamnosyl-glucosides des composés d'arômes.

> β-D-glucosidase (figure 6)

Dans le cas des diglycosides, elle libère l'aglycone après la coupure du sucre terminal par une α-L-arabinofuranosidase et une α-L-rhamnosidase selon un mécanisme séquentiel. A partir des monoglycosides, il y a libération de substances volatiles (monoterpénols, norisoprénoïdes, phénols volatils).

Uréases

L'urée est le précurseur majeur de l'éthylcarbamate, considéré, suite à l'administration à hautes doses à des animaux de laboratoire, comme potentiellement cancérigène. L'éthyl carbamate est un produit naturel de toutes les boissons et aliments fermentés. La teneur maximale admise dans les vins est réglementée dans certains pays importateurs. Pour limiter la présence de cette molécule, la dégradation enzymatique de l'urée apparaît comme étant une solution pour éliminer à la source la formation d'éthylcarbamate. Cette enzyme produite par la souche *Lactobacillus fermentum* est peu, voire plus utilisée dans les chais.

β-glucanases non cellulolytiques

Les exo-(1→3)-β-glucanases et les (1→6)-β-D-glucanases sont capables de dégrader les glucanes produits par *Botrytis cinerea*, que l'on retrouve dans les moûts atteints de pourriture grise ou noble et les polysaccharides pariétaux des levures **[R20]**. La température optimale est comprise entre 30 et 50°C et le pH optimal d'activité oscille entre 4,5 et 6.

Lysozyme

Le lysozyme est une enzyme présente dans les blancs d'œufs. C'est un conservateur naturel utilisé depuis très longtemps en pharmacie ainsi qu'en industrie alimentaire, notamment dans les fromages puisqu'il agit spécifiquement contre les bactéries Gram+ dont les bactéries lactiques. Afin d'assurer la stabilité microbiologique des vins, il est communément employé de l'anhydride sulfureux (SO_2). Il a été montré dans de nombreuses études **[R22 ; R23]** que le lyzozyme, en inhibant les bactéries lactiques, pouvait être employé pour assurer la stabilité microbienne des vins et permettait ainsi une réduction des doses de SO_2 employé. Il permet de bloquer la fermentation malolactique (FML) des vins blancs, de stabiliser les vins rouges après FML et de protéger les vins où la fermentation alcoolique est languissante.

Protéases (à l'étude)

L'usage de la bentonite pour limiter les casses protéiques a été rendu responsable d'un appauvrissement organoleptique des vins et l'utilisation alternative d'enzymes protéolytiques est évaluée. Or, si les protéases exogènes restent bien actives dans les conditions (pH, teneur en alcool) des moûts et des vins, il semble qu'elles restent sans effet sur leur contenu protéique. Cependant, de nouveaux travaux **[R21]** relancent l'intérêt de l'utilisation de ces enzymes et mettent en évidence les conditions de leur action (dénaturation préalable des protéines par la chaleur). Sans être une solution exclusive de stabilisation protéique, un traitement des moûts et des vins blancs aux protéases permettrait de réduire significativement la dose de bentonite utilisée ultérieurement. L'OIV étudie aussi l'intérêt plus large des protéases sur les autres applications œnologiques tant sur les moûts que sur les vins.

Le tableau n°1 permet de montrer la relation théorique entre les activités enzymatiques et les effets technologiques. Ainsi, l'offre des enzymes œnologiques est structurée aujourd'hui autour de trois grandes familles de préparations enzymatiques :

• Les préparations dites pectolytiques sont les plus largement utilisées en œnologie. Elles possèdent trois activités dominantes : polygalacturonase, pectine lyase et pectine-méthyl-estérase. Ces activités participent à la dégradation de la chaîne primaire de la pectine du raisin d'où leur effet remarqué pour la macération et la dépectinisation/clarification. Les préparations enzymatiques contiennent d'autres activités présentes dans une moindre concentration par rapport aux activités nommées ci-dessous. Ces dernières sont les hémicellulases, les cellulases, la β-glucosidase.

• Les préparations dites libératrices d'arômes à base de glycosidases dont la fonction est la révélation des arômes variétaux du raisin et plus particulièrement des arômes de la famille des terpénols.

• Les préparations à base de glucanases qui exercent une fonction spécifique de dégradation des glucanes excrétés par *Botrytis cinerea* et des polysaccharides pariétaux des levures.

Activités enzymatiques		Opérations préfermentaires				Opérations post - fermentaires		
		Débourbage	Clarification	Pressurage	Extraction / Macération	Libération d'arômes	Amélioration de la filtrabilité	Elevage sur lies
Pectolytiques	Polygalacturonase (PG)	■	■	■	■		■	
	Pectine Lyase (PL)	■	■	■	■		■	
	Pectine Méthyl Estérase (PME)	■	■	■	■		■	
	Galactanase		■				■	
Hemicellulolytiques	Xylanase			■	■			
Cellulases	Endo - (1→4) - β - D-Glucanase			■	■		■	■
	Exo - (1→4) - β - D-Glucanase			■	■		■	■
Glycosidases	β - D - glucosidase			■	■	■		
	α - L - arabino - furanosidase			■	■	■		
	α - L - rhamnosidase			■	■	■		■
Glucanases	exo (1→3) et (1→6) β - D - glucanases		■				■	■

Tableau 1 : Tableau de synthèse : enzymes et rôles technologiques

Bibliographie

R1. Marteau G., Scheur J., Olivieri C. 1963. Le rôle des enzymes pectolytiques du raisin ou de préparations commerciales dans la clarification des jus. *Ann. Technol. Agric.*, 12 : 155-176.

R2. Datunashvili EN., Tyrina SS., Kardash NK. 1976. Some properties of grape pectin methylesterase. *Appl. Biochem. Microbiol.,* 12 : 36-40.

R3. Villettaz J.C. 1984. Les enzymes en œnologie. *Bulletin de l'O.I.V.*, 635 : 19-29.

R4. Günata YZ., Biron C., Sapis JC., Bayonove C. 1989. Glycosidase activities in sound and rotten grapes in relation to hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides. *Vitis,* 28 : 191-197.

R5. Flanzy C. 1998. Œnologie - Fondements scientifiques et technologiques. *Ed. Tec & Doc Lavoisier*, 376-393.

R6. Nunan KJ., Davies C., Robinson SP., Fincher GB. 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry developpement. *Planta.*, 214(2) : 257-64.

R7. Barnavon L. 1999. Etude d'enzymes et de l'expression des gènes correspondants impliqués dans l'évolution des polysaccharides pariétaux au cours du développement de la baie de raisin. Thèse Doctorat, Université Montpellier II.

R8. Strauss ML., Jolly NP., Labrechts M.G., Van Rensburg P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. J. Appl. Microbiol., 91(1) : 182-190.

R9. Van Rensburg P., Pretorius I.S. 2000. Enzymes in winemaking. Harnessing Natural Catalysts for Efficient Biotransformations - A Review. South African Journal of Enology and Viticulture, 21 (Special issue) : 52-73.

R10. Coombe BG. 1987. Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. American Journal of Enology and Viticulture, 38(2), 120-127.

R11. Carpita NC., Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary-cell walls in flowering plants – Consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. Plant Journal, 3(1), 1-30.

R12. Fougère-Riffot M., Cholet C., Bouard J. 1996. Evolution des parois des cellules de l'hypoderme de la baie de raisin lors de leur transformation en cellules de pulpe. Journal International de la Vigne et du Vin, 30(2), 47-51.

R13. Tierny Y. 1992. Clonage et expression chez *Escherichia coli* de gènes de Bactéroides thetaiotaomicron impliqués dans la dégradation des pectines. Thèse de doctorat Sciences de la Vie et de la Santé, Université des Sciences et Technologies de Lille.

R14. Guerrand D. 2000. Rôle des différentes activités présentes dans les préparations enzymatiques pour l'œnologie. Compte rendu technique Sofralab , 8p.

R15. Doco T., Williams P., Pauly M., O'Neill M.A., Pellerin P. 2003. Polysaccharides from grapes berry cell walls. partII. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. Carbohydrate polymers 53, 253-261.

R16. Ducasse M.A., Canal-llauberes R.M., de Lumley M., Willimas P., Souquet J.M., Fulcrand H., Doco T., Cheynier V. 2010. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. Food Chemistry. Volume 118, Issue 2, pages 369–376

R17. Gilkes N.R., Henrissat B., Kilburn D.G., Miller R.C., Warren RAJ. 1991. Domains in microbial b-1-4-glycanases : sequence conservation, function, and enzymes families. *Microbiol. Reviews*, 55 : 303-315.

R18. Cordonnier R. et Baynove C. 1974. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété muscat d'Alexandrie de monoterpènes liés, révélables par plusieurs enzymes du fruit. *C.R. Aca*. Sci., 278, série D, 3387-3390.

R19. Gunata Z., Bitteur S., Brioullet J.M., Bayonove C., Cordonnier R. 1988. Sequential enzymatic hydrolysis of potential aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.*, 184, 139-149.

R20. Dubourdieu D., Villettaz J.C., Desplanques C., Ribéreau-Gayon P. 1981. Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris. *Conn. Vigne Vin*, 15 : 161-177.

R21. Marangon M., Van Sluyter S.C., Robinson E., Muhlac R., Holt H., Haynes P.A., Godden P., Smith P., Waters E. 2012. Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. Food Chemistry 135. 1157-1165.

R22. Gerbaux V., Villa A., Monamy C., et Bertrand A. 1997. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. Am. J. Enol. Viticulture. 48. 49-54.

R23. Gerbaux V., Meistermann E., Cottereau P., Barriere C., Cuinier C., Berger J.L., and Villa A., Utilisation de la lyzozyme en œnologie. 1999. Bull OIV. 72. 348-73.

Chapitre 3
La réglementation des enzymes

Cadre général

Les enzymes alimentaires sont considérées dans l'immense majorité de leurs utilisations comme des auxiliaires technologiques, c'est-à-dire qu'elles interviennent dans le procédé d'élaboration d'une denrée alimentaire mais n'exercent pas de fonction dans le produit fini. Elles sont encadrées par des dispositifs réglementaires très divers selon les pays. Le JECFA, l'organisme scientifique d'évaluation de sécurité alimentaire du *Codex Alimentarius* (organisation liée à l'ONU établissant les normes alimentaires dans le monde), procède à des évaluations et établit des spécifications pour les préparations enzymatiques ainsi qu'une nomenclature qui nomme chaque activité enzymatique. Cette nomenclature est reconnue par les 188 pays membres du *Codex alimentarius*.

Dans l'Union Européenne, les enzymes font partie, au même titre que toutes les substances utilisées dans l'élaboration des denrées alimentaires, du programme d'évaluation et d'autorisation de mise en marché : le FIAP (Food Improvement Agents Package). Ce programme européen lancé en 2008 définit des mesures spécifiques pour les enzymes quant à leur procédure de mise en marché et de production à travers les règlements (CE) 1332/2008 et (CE) 1331/2008. Il prévoit également un ambitieux plan d'évaluation de sécurité et de besoin technologique par les états membres de l'Union Européenne pour chaque enzyme alimentaire mise sur le marché européen et doit aboutir à une liste d'enzymes autorisées d'ici 2020.

Parallèlement à ce dispositif européen qui demeure la référence règlementaire appliquée par les 28 états membres, l'OIV a défini et décrit les activités enzymatiques utiles à l'élaboration du vin. La monographie OENO 365-2009* sur les préparations enzymatiques a été modifiée en 2012. Cette modification visait à introduire les dernières connaissances sur les enzymes, précisément décrites dans la nouvelle fiche du Code des pratiques œnologiques adopté en Juin 2013 (OENO 498/2013*). La monographie sur les préparations enzymatiques donne également des recommandations sur les modalités de production et d'étiquetage. Chaque activité enzymatique admise dans une préparation enzymatique œnologique est par ailleurs décrite dans des monographies spécifiques. Ces monographies décrivent entre autres des méthodes analytiques pouvant être appliquées pour la mesure des différentes activités enzymatiques.

Aujourd'hui, les préparations enzymatiques sont admises dans le vin pour les applications suivantes :

- filtrabilité sur moûts (OENO 14/04)* et sur vins (OENO 15/04)
- libération d'arômes sur moût (OENO 16/04) et sur vins (OENO 17/04)
- libération de composés levuriens sur vins (OENO 18/04) ;
- clarification sur moûts (OENO 11/04) et sur vins (OENO 12/04)
- macération sur moûts (OENO 13/04)
- hydrolyse des glucanes de *Botrytis cinerea* (OENO 03/85)
- hydrolyse de l'urée (OENO 2/95)

Modifiées par OENO 498/2013

- hydrolyse des protéines (en procédure d'adoption en 2014).

**: Numéro des résolutions disponibles sur le site de l'OIV (http://www.oiv.int)*

Focus sur la vinification des vins biologiques [R24]

Le cahier des charges pour l'élaboration des vins biologiques, établi dans le règlement de la Commission Européenne (CE) 203-2012, limite à ce jour l'utilisation des enzymes œnologiques aux préparations d'enzymes pectolytiques pour un usage de clarification uniquement. Les bétaglucanases et le lysozyme sont interdits à ce jour.

La mesure des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques présentées précédemment peuvent être dosées et chaque protocole a fait l'objet d'une adoption à l'OIV. L'OIV recommande que ces mesures soient exprimées en nanokatal (nanomoles de produit formé/seconde dans les conditions définies par le protocole) et/ou en U/g de préparation, sauf pour la mesure globale par rhéologie. Ces unités de mesure homogènes ont pour objectif d'apporter des résultats comparables entre eux.

Ces méthodes ont été développées afin d'avoir une meilleure connaissance de la composition des préparations enzymatiques commerciales **[R25]**, et également de pouvoir relier le profil des activités enzymatiques de ces préparations aux effets technologiques annoncés.
Ces méthodes reposent sur la détermination des produits libérés par les enzymes et/ou inversement sur la dégradation du substrat par ces dernières. Les méthodes proposées se veulent "simples" de mise en œuvre (essentiellement des mesures par spectrophotométrie), mais elles requièrent une expertise analytique et une bonne connaissance des enzymes, pour interpréter à bon escient les résultats.
Il est donné dans le tableau suivant (Tableaun°2) les méthodes adoptées par l'OIV et/ou en cours d'adoption. Le détail opératoire de chacune de ces méthodes est disponible sur le site de l'OIV.

Tableau n°2 : Récapitulatif des méthodes de mesure des activités enzymatiques décrites précédemment

Activités enzymatiques	Principe de la mesure	Principe du dosage	Date d'adoption de la résolution à l'OIV
Pectine Méthyl Estérase (PME)	Mesure du méthanol libéré	Dosage du formaldéhyde formé (Klavons et Bennet, 1986)	Adoptée en juin 2008 (oeno 9/2008) révisée en 2012 (OIV-oeno 363-2012)
	Mesure des groupes carboxyliques formés à partir de la pectine	Dosage acido-basique par mesure du volume de soude 0,01 M versé	Adoptée en 2012 (OIV-oeno 363-2012)
Pectine Lyase (PL)	Mesure de la délocalisation de la double liaison conjuguée	Variation d'absorbance à 235 nm	Adoptée en juin 2009 (oeno 314/2009) modifiée en 2012 (OIV-oeno 491-2012)
Endo et exo-polygalacturonase (PG)	Mesure de l'acide galacturonique libéré	Dosage des sucres réducteurs libérés (Méthode de Nelson, 1944)	Adoptée en juin 2008 (oeno 10/2008) révisée en 2012 (OIV-oeno 364-2012)
		Dosage avec 2-cyanoacétamide	Adoptée en 2012 (OIV-oeno 364-2012)
	Réduction de la moitié de la viscosité d'une solution standard	Mesure de la chute de la viscosité sur un temps donné	Adoptée en juin 2009 (oeno 351/2009)
Endo (1-4) β -D- Xylanase	Mesure du xylose libéré	Dosage des sucres réducteurs (Méthode de Nelson, 1944)	Proposition en cours
Endo-α (1,5) arabinanase	Mesure de l'azurine libéré	Dosage à 590 nm	Adoptée en 2012 (OIV-oeno 412-2012)
Endo (1-4) β -D- Galactanase	Mesure du galactose libéré	Dosage des sucres réducteurs (Méthode de Nelson, 1944)	Adoptée en juin 2009 (oeno 313/2009) révisée en 2012 (OIV-oeno 490-2012)
Endo (1-4) β -D- glucanase	Mesure du glucose libéré	Dosage des sucres réducteurs (Méthode de Nelson, 1944)	Adoptée en juin 2008 (oeno 8/2008) révisée en 2012 (OIV-oeno 4868-2012)
Endo (1-3, 1-6) β -D- glucanase	Mesure du glucose libéré	Dosage par la méthode au DNS-phénol	Adoptée en juin 2010 (oeno 340/2010) et révisée en 2013 (OIV-oeno 488-2013)
Cinnamoyl estérase (CE)	Mesure de la dégradation du substrat (acide chlorogénique)	Dosage de la variation d'absorbance à 350 nm	Adoptée en juin 2007 (oeno 6/2007), révisée en 2013 (OIV-oeno 487-2013)
	Mesure de la dégradation du cinnamate d'éthyle	Mesure par HPLC	
β -D- glucosidase	Mesure du paranitrophénol libéré	Dosage de l'absorbance à 400 nm	Adoptée en juin 2007 (oeno 5/2007), révisée en 2012 (OIV-oeno 451-2012) + (OIV-oeno 489-2012)
β -D- galactosidase			
α -L- rhamnosidase			
α -L- arabinofuranosidase			
β -D- xylosidase			

Il s'avère que la corrélation entre le profil des activités enzymatiques **[R26 ; R27 ; R28 ; R29]** et l'effet technologique n'est pas facile à déterminer. En effet, la relation semble bien établie pour les préparations dites spécifiques (libératrices d'arômes, filtration, élevage sur lies,..). Mais elle est plus difficile à mettre en évidence pour les préparations commerciales faisant appel essentiellement aux enzymes pectolytiques (pressurage, débourbage, clarification, extraction,…). Il convient de se rappeler que les préparations utilisées sont, de par leur nature biologique, une combinaison complexe d'activités dont la synergie est difficile à quantifier. Par ailleurs, les paramètres qualitatifs de la matière première (cépage, maturité, état sanitaire, pH…), ainsi que les conditions de vinification, influencent fortement le résultat final de l'action des enzymes. C'est la raison pour laquelle ces mesures nous permettent d'avoir une meilleure connaissance des produits utilisés, mais il sera toujours nécessaire de réaliser des tests technologiques complémentaires pour estimer la performance des préparations.

Bibliographie :

R24. Pladeau V., Pic L., et Cottereau P. 2013. Réussir les points clés de la vinification bio. Dernières avancées techniques. (Disponible sur le site internet de l'IFV).

R25. Guerin L., Sutter D.H., Demois A., Chereau M., et Trandafir G. 2009. Enzymes in winemaking determination and comparison of enzymatic profiles of the main commercial preparations, AJEV, (60:3), 322-331.

R26. Cayla L., Cottereau P., Masson G., Guérin L. 2009. Les enzymes en œnologie ; 1er volet : Intérêt dans les opérations préfermentaires sur vin rosé. Revue Française d'œnologie, n°234, Cahier Technique p2-9.

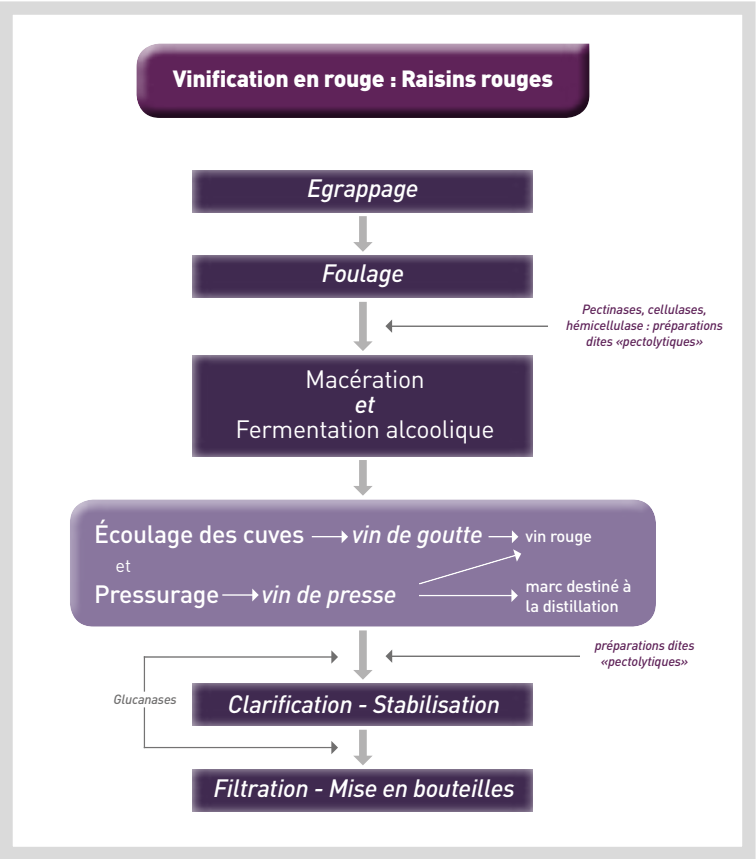
R27. Guerin L., Chatelet B., Anneraud C., Vinsonneau E., Davaud F., Solanet D., et Vuchot P. 2011. Les enzymes en œnologie- 2ème volet : Intérêt dans les opérations fermentaires sur vin rouge. Revue française d'œnologie, n°244. Cahier Technique P7-18.

R28. Guerin L., Beguin J., Charrier F., Meistermann E., Crachereau J-C., Schneider R. 2013. Les enzymes en œnologie – 3ème volet : Intérêt dans les opérations préfermentaires sur vin blanc. Revue française d'œnologie, n°256. Cahier technique p2-12.

R29. Guerin L., Beguin J., Cayla L., Charrier F., Meistermann E., Schneider R., Gerbaux V., Briffox C., Crachereau J-C. Les enzymes en œnologie : 4ème Volet : Intérêt dans les opérations post-fermentaires sur vins blanc et rosé. Revue française d'œnologie. 2014 (en cours de relecture).

Chapitre 4

La mise en œuvre des préparations enzymatiques dans l'élaboration du vin



Les grandes applications des enzymes en œnologie peuvent être résumées à partir des itinéraires en rouge et en blanc et rosé proposés (figures n°7 et 8). L'ensemble des opérations pré et postfermentaires est repris en détails dans les paragraphes suivants.

Figure 7 : Itinéraire de vinification en rouge

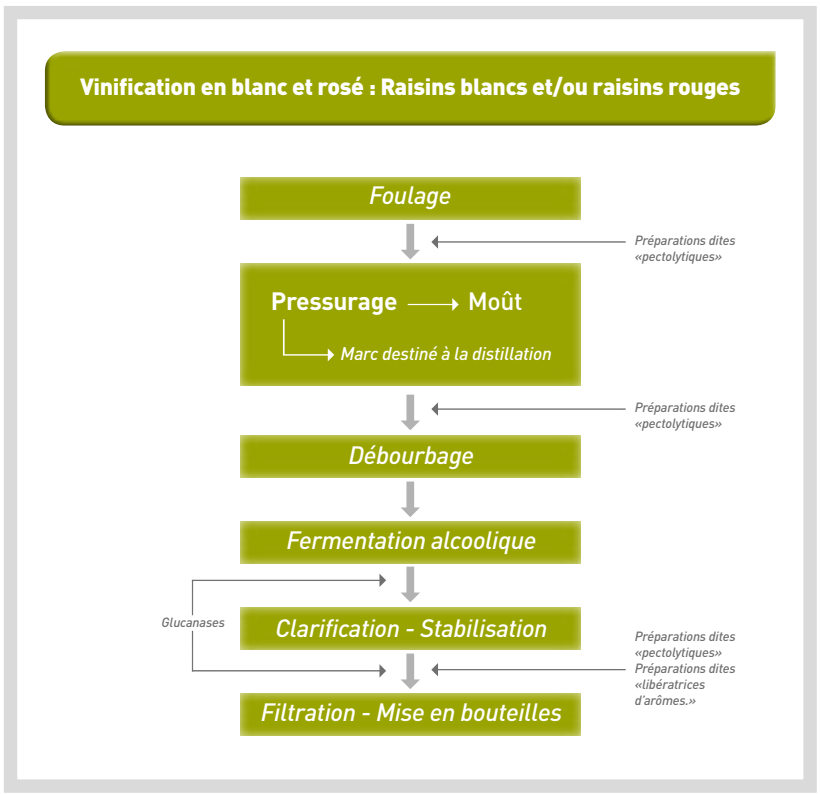


Figure 8 : Itinéraire de vinification en blanc et rosé

Pressurage

Objectifs [R30] : L'utilisation d'enzymes a pour objet de dégrader les polysaccharides pariétaux des baies de raisins et ainsi, faciliter la libération du jus, des précurseurs aromatiques et des composés phénoliques. Les enzymes pectolytiques sont employées pour faciliter l'opération de pressurage, en particulier pour traiter les cépages réputés riches en pectines et à pulpe visqueuse. Cet apport précoce d'enzyme est ensuite habituellement suffisant pour assurer la clarification des jus en vue de leur débourbage.

Mise en œuvre : L'ajout d'enzymes est réalisé au moment du pressurage, ou mieux encore, durant la phase de macération entre la récolte et le pressurage. Il est nécessaire d'assurer une bonne homogénéisation des enzymes au sein de la vendange. Il est important de protéger les raisins, puis le moût (inertage, ajout de SO_2 ou autres auxiliaires), qu'il y ait ou non ajout d'enzymes.

Mesure de l'efficacité technologique : L'estimation du rendement au pressurage (hl/to de raisins) est l'indicateur le plus pertinent. Il est intéressant également d'estimer le volume d'égouttage, le volume de jus pressé, et la quantité de marc. Afin d'estimer la bonne action des enzymes, un test "simple" peut-être appliqué : test pectines-glucanes (voir encadré p.21).

Résultats expérimentaux et autres : Sur le plan technologique, l'action des enzymes se traduit par la libération d'une plus grande quantité de jus (augmentation du taux d'extraction de 5 à 10%), mais aussi d'une plus grande proportion de jus "qualitatif", de goutte ou collecte à basse pression. L'effet varie selon les cépages, le niveau de maturité, le temps d'action de l'enzyme **[R27 ; R28 ; R26 ; R31]**.
Par ailleurs, cette action enzymatique, en fragilisant la paroi des cellules, est également conseillée pour faciliter l'extraction des précurseurs aromatiques de la pellicule dans le jus **[R32]**.
Sur le plan pratique, un tel enzymage précoce contribue à raccourcir les étapes préfermentaires **[R33]** et permet, de fait, d'optimiser les équipements affectés à cette tâche.
Les résultats sont d'autant plus probants que le pressurage est couplé à une macération pelliculaire plus ou moins longue.

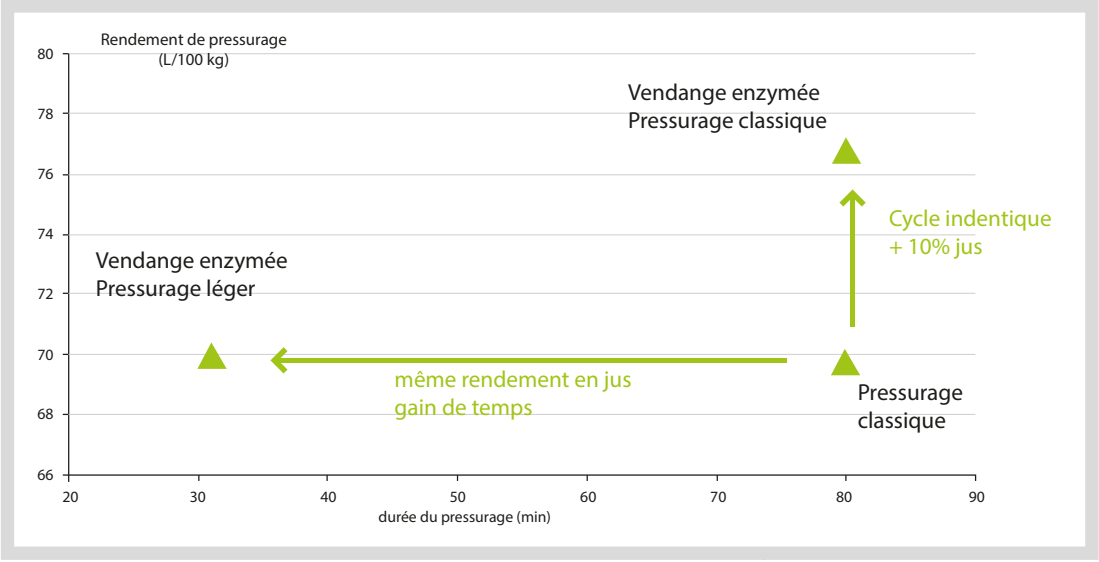


Figure 9 : Evolution du rendement en jus total mesuré après pressurage en fonction de la durée de pressurage et de l'ajout ou non d'enzymes pectolytiques – Grenache, IFV Nîmes 2001

Débourbage

Le débourbage des moûts en vinification en blanc fut l'une des toutes premières utilisations des enzymes en œnologie.

Débourbage statique

Objectifs : Le moût issu du pressurage est naturellement trouble, il contient des bourbes en quantités variables selon l'intensité des traitements mécaniques appliqués à la vendange. Les bourbes grossières (taille > 200 microns) ont une influence défavorable sur la qualité et la finesse aromatique des vins. Le débourbage est généralement spontané mais pour certains cépages, il doit être provoqué par l'ajout de pectinases. L'efficacité de l'enzymage à cette étape dépend du cépage, de la maturité du raisin, des conditions de récolte et de pressurage. Dans tous les cas, le phénomène sera accéléré, ce qui présente un intérêt pour les exploitations travaillant avec de nombreuses rotations de cuveries.

Mise en œuvre : Dès la sortie du pressoir, pour une utilisation sur jus, mais il est possible de les introduire très tôt, au cours du remplissage du pressoir, même sur raisins (voir "pressurage"). Les doses d'enzymes à utiliser sont à nuancer en fonction de la charge en bourbes initiale du moût, le temps dont on dispose pour le débourbage, et la température du moût. La capacité du moût à se clarifier (spontanément ou non) peut être estimée par la mesure de capacité de clarification (voir encadré p.23).

Mesure de l'efficacité technologique : L'intensité du débourbage peut s'apprécier par la mesure de la turbidité, qui s'exprime en unité de néphélométrie ou NTU (*Nephelemotric Turbidity Unit*), et se mesurer à l'aide d'un turbidimètre (parfois appelé néphélomètre). Afin d'estimer la bonne action des enzymes, un test "simple" peut-être appliqué : test pectines-glucanes (voir encadré ci-dessous).

Test pectines-glucanes

Mise en évidence des pectines dans les moûts et vins :

Solution utilisée : éthanol 96°C acidifié avec 0.5% d'acide chlorhydrique concentré

Dans un tube à essai, mélanger délicatement 2 volumes d'alcool pour 1 volume de moût ou de vin.

- Il y a *beaucoup de pectines* lorsqu'un anneau gélifié se forme à la surface du tube après une dizaine de minutes
- Il y a *peu de pectine* lorsque les bulles formées lors de l'agitation remontent difficilement (elles sont retenues par la pectine insolubilisée)
- Il n'y a *pas de pectine* lorsque le mélange est parfaitement limpide et brillant après 10 minutes.

Mise en évidence des glucanes :

Pour détecter d'importantes quantités de glucanes (>15mg/l) :

Dans un tube à essais, mélanger 4 volumes d'éthanol à 6 volumes de moût ou de vin.

- Il y a *des glucanes* si des filaments blancs ou gris apparaissent

Pour détecter des plus faibles quantités de glucanes (entre 3 et 15 mg/l) :

Mélanger 30 ml de moût ou de vin avec 20 ml d'éthanol. Après 30 minutes de réaction, centrifuger 20 minutes à 3000tr/min. Eliminer le surnageant, diluer le précipité dans 6 ml d'eau et ajouter 4 ml d'éthanol.

- Il y a de *faibles quantités de glucanes* si des filaments blancs ou gris apparaissent.

Résultats expérimentaux et autres : Avec l'emploi d'enzymes, la cinétique de clarification est nettement améliorée, l'utilisation est même nécessaire pour certains cépages, quel que soit le millésime **[R26 ; R27]** (figure n°10). Cependant, le contrôle de la turbidité à atteindre est important, afin de ne pas arriver à des niveaux pouvant entraîner des problèmes fermentaires (Turbidité < 50 NTU). L'application des enzymes pectolytiques reste optimale sur des raisins sains et/ou des moûts obtenus à partir de raisins sains ; la présence de *Botrytis cinerea*, et plus particulièrement sa production de glucanes, limite fortement une bonne sédimentation des bourbes. Dans les essais conduits par l'IFV, et plus particulièrement lorsque les préparations commerciales sont appliquées sur raisins, et non sur jus pressé, il a été observé un tassement moindre des bourbes en comparaison à un jus non enzymé. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'enrichissement en pectines est supérieur à l'hydrolyse. De plus, il avait été noté que les vins issus d'un enzymage sur raisins présentent des intensités colorantes plus élevées (globalement une absorbance à 420nm deux fois plus élevée que la modalité témoin). Sans doute que ces résultats seraient plus nuancés avec une conduite du pressurage plus adaptée à l'emploi d'enzyme.

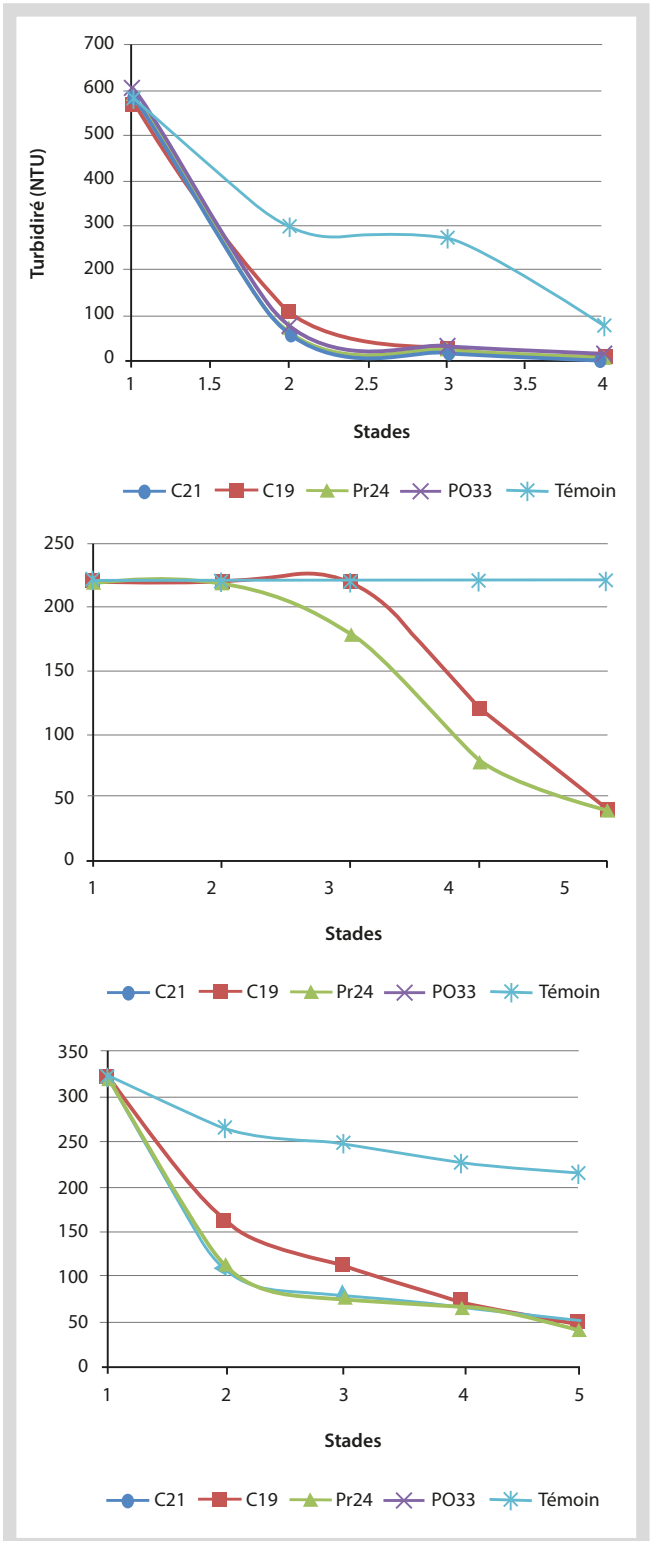
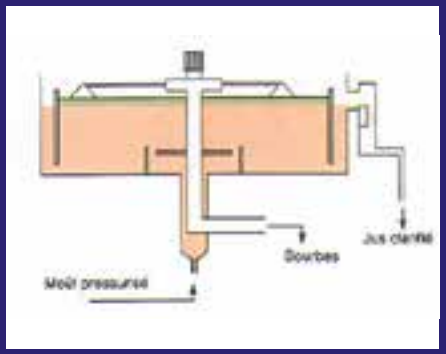


Figure n°10 : Cinétique de clarification (Turbidité NTU) pour 3 cépages différents (de haut en bas : Chenin, Melon B et Sylvaner), récoltés sur le millésime 2004 et l'utilisation de 4 préparations enzymatiques (Stade 1 : Jus pressé (T0) ; Stade 2 : 1er point de prélèvement ; Stade 3 : 2ème point de prélèvement ; Stade 4 : fin débourbage ; Stade 5 : après soutirage)

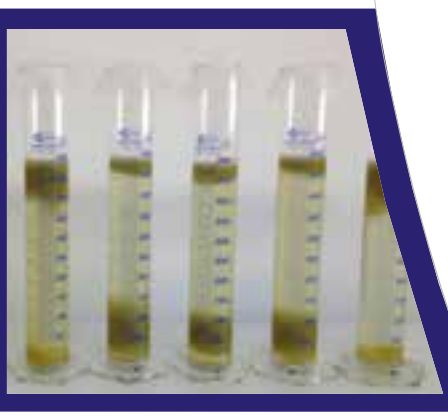
Débourbage dynamique : cas particulier de la flottation

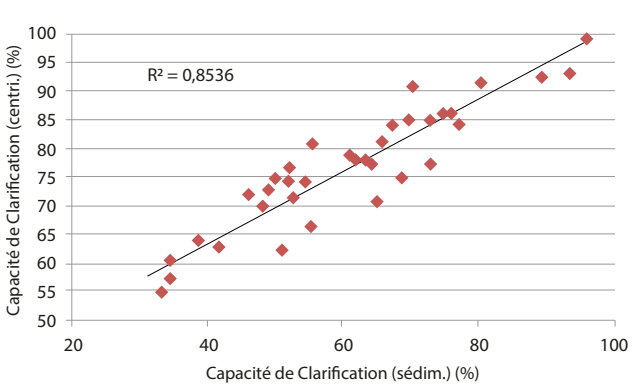
La clarification par flottation permet un débourbage en continu, avec un débit important, un niveau de clarification satisfaisant, mais surtout l'élimination d'une partie des polyphénols, diminuant d'autant la teneur en substrats oxydables. Cependant, les moûts doivent être complètement dépectinisés pour permettre une prise de colle et une flottation efficaces. L'utilisation des enzymes pectolytiques permet, dans un laps de temps modéré, d'arriver à ce résultat. Les enzymes sont appliquées en sortie de fouloir et/ou de pressoir. L'intensité du débourbage peut s'apprécier par la mesure de la turbidité, qui s'exprime en NTU et se mesurer à l'aide d'un turbidimètre et par le rendement du flottateur. Afin d'estimer la bonne action des enzymes, un test "simple" peut-être appliqué : test pectines-glucanes (voir encadré p.21).

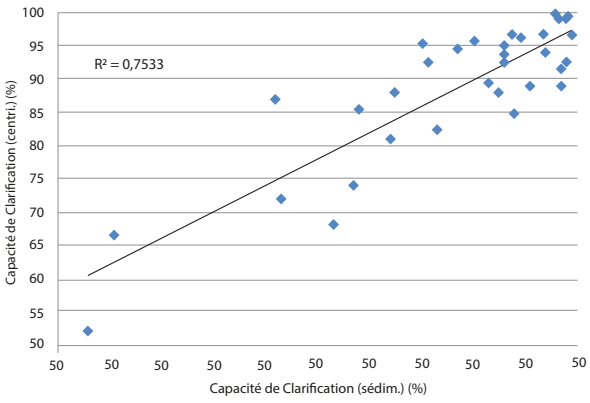


Capacité de clarification

La capacité de clarification des jus paraît être un bon outil pour décider de l'apport ou non d'enzymes.
La capacité de clarification des jus a été mesurée de deux façons différentes :
L'une correspond à la mesure de la turbidité finale, après 24 heures à 20°C, du jus placé dans une éprouvette de 250 ml et l'autre, à la mesure de la turbidité finale, après centrifugation à 2500 g pendant 10 minutes à 20°C, du même jus placé dans l'éprouvette ; ces mesures ont permis de calculer d'une part la capacité de clarification, appelée "sédim" et d'autre part la capacité de clarification nommée "centrif". La capacité de clarification s'exprime de la façon suivante : 100 – (100 x Tfinale / Tinitiale). Ainsi, on peut observer sur les figures 11 et 12 qu'il est possible de prédire le bon déroulement de la clarification du jus. Cet indicateur peut être couplé à la détection des pectines et glucanes, cependant ces mesures sont réalisables uniquement sur vendanges non altérées ; en effet, ces dernières nécessitent d'autres alternatives que sont l'utilisation de glucanases (β1,3 ; β1,6).







Figures n°11 et 12 : Corrélation entre les mesures de turbidité après sédimentation et après centrifugation (figure de gauche : Grenache et Cinsault – figure de droite : Chenin, Melon et Riesling) - 2003 à 2006

Extraction des composés phénoliques

Concernant cette application, même si elle est devenue courante, les résultats expérimentaux associés sont controversés.

Objectifs : L'utilisation d'enzymes pectolytiques, cellulolytiques et hémicellulolytiques au cours de la macération des raisins rouges, permet d'accéder plus rapidement et avec plus d'efficacité au contenu intra-cellulaire de la pellicule. Il en résulte dans la plupart des cas des vins plus structurés, plus faciles à clarifier et à filtrer et dont le rendement au pressurage est plus important.

Mise en œuvre : Sur raisins, et/ou en début d'encuvage, avec un remontage d'homogénéisation.

Mesure de l'efficacité technologique : La mesure des anthocyanes, des composés phénoliques totaux (CPT) et des tanins, est le meilleur critère d'appréciation ; les critères qualitatifs liés à la couleur peuvent être pris en compte (absorbance aux longueurs d'ondes = 420, 520, 620nm).

Résultats expérimentaux et autres : Selon certains auteurs, les vins enzymés sont plus structurés, plus ronds, plus fruités et la couleur est plus stable **[R34] [R35].** En effet, les anthocyanes sont des composés fragiles mais qui sont stabilisés lorsqu'ils se complexent avec les tannins **[R32].** Cependant, les activités cellulases incluent des β-D-glucosidases, enzymes qui dégradent ces mêmes anthocyanes. L'utilisation de β-D-glucosidases à faible affinité pour les flavonoïdes est donc nécessaire **[R33 ; R37]**. Dans les travaux menés par l'IFV de 2002 à 2007, sur 5 cépages "rouge", et avec l'utilisation de 7 préparations enzymatiques différentes, il s'avère que l'effet le plus probant sur la couleur et les tanins est obtenu avec l'utilisation de préparations sur des raisins en sous-maturité **[R27]**. Les résultats obtenus avec l'utilisation des enzymes sur des raisins à maturité sont très variables, en fonction du cépage, du millésime, et de l'itinéraire de vinification.

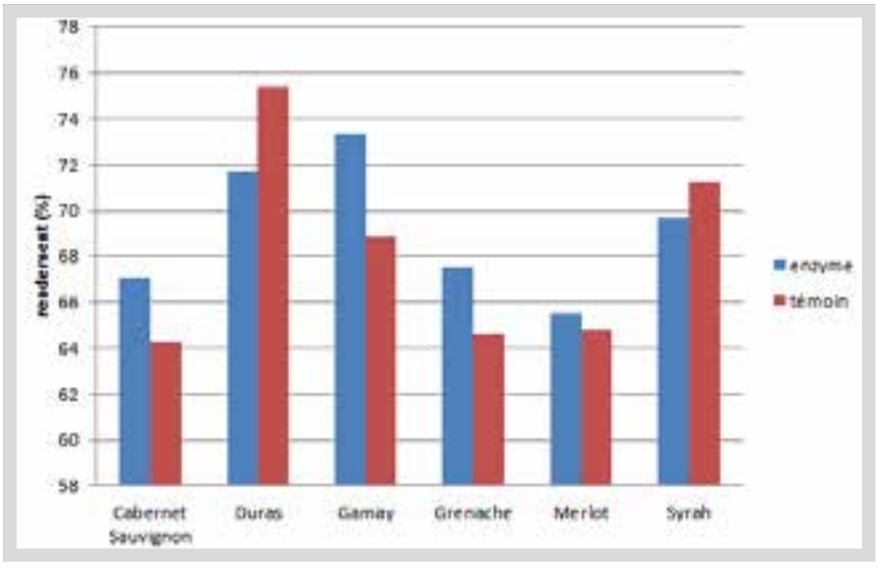


Figure n°13 : Les rendements de pressurage obtenus pour l'ensemble des essais associés à un même cépage. On observe ainsi un bénéfice pour les cépages suivants : Gamay (6,2% de gain/Témoin) ; Cabernet Sauvignon (4,5% de gain/Témoin) et le Grenache (4,3% de gain/Témoin)

Cependant, le rendement de jus de goutte était plus important sur la modalité "enzymée" (fig. N°13), de même que la clarification des vins et leur filtrabilité. Les vins issus des modalités "enzymés" ont été jugés plus tanniques à la dégustation. Des travaux plus récents ont montré le rôle joué par les pectinases, sur la composition à la fois en polyphénols et en polysaccharides de vins de Merlot âgés de 20 mois **[R38]**. Sur trois millésimes, les vins enzymés étaient enrichis en polysaccharides tel que le RGII. L'augmentation de l'intensité colorante modifiée, et des tanins condensés a été observée dans les vins enzymés deux millésimes sur trois. Ces résultats confirment que les préparations enzymatiques dégradent les parois cellulaires et libèrent des polysaccharides et que l'extraction des polyphénols qui en découle est fonction du millésime et de l'itinéraire de vinification.

> Cas particulier de la cinnamoyl estérase

Parmi les activités secondaires présentes dans les préparations commerciales, l'activité cinnamoyl estérase peut favoriser dans certaines conditions l'apparition de déviations organoleptiques des vins. La cinnamoyl estérase hydrolyse les esters des acides hydroxycinnamiques (dont les esters tartriques très répandus chez l'espèce *Vitis vinifera*) en acides phénols. Puis des phénols volatiles sont formés par l'action de la cinnamate décarboxylase présente chez certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae*.
Dans les vins blancs, on retrouve des vinyl-phénols responsables des odeurs de gouache, pharmaceutiques, de clou de girofle **[R39]**.

Dans les vins rouges, on ne retrouve des éthyl-phénols (écurie, sueur de cheval, cuir, fumé, épicé) que dans le cas de contamination accidentelle par la levure *Brettanomyces dekkera*. Toutefois, il a été montré que l'utilisation de préparations commerciales non purifiées en cinnamoyl estérase augmentait considérablement le risque d'apparition de ces éthyl-phénols en présence de *Brettanomyces* **[R40]**.
Pour pallier ce problème, les fabricants d'enzymes ont développé des préparations dites FCE (Free Cinnamoyl Esterase) en les purifiant par ultracentrifugation.
De récentes recherches **[R41 ; R42]** ont apporté une nouvelle approche de l'activité de la cinnamoyl estérase dans le vin. Son action sur la couleur pourrait être positive dans des conditions d'application particulières (traitement avant la fermentation alcoolique et fermentation conduite par une levure Pof+). L'utilisation d'un couple enzymes/levures particulier en agissant sur les acides cinnamiques pourrait conduire à la formation de pigments dérivés des anthocyanes (type carboxypyranoanthocyanes) et permettrait d'améliorer la stabilité de la couleur. L'association enzymes/levures implique donc une approche très spécifique pour un impact œnologique précis.

Thermovinification

Objectifs : Le chauffage de la vendange entraîne une solubilisation accrue de la pectine et une inactivation des enzymes endogènes et le moût devient quasi impossible à clarifier. L'utilisation d'enzymes exogènes est nécessaire pour dégrader tout ou partie de la pectine soluble et ainsi faciliter le pressurage et la clarification.

Mise en œuvre : Les enzymes peuvent être ajoutées à la réception des raisins ou après traitement, lorsque la température a commencé à diminuer. En effet, l'extraction optimale de la couleur se situe pour des températures de macération de l'ordre de 70 à 75°C, et l'optimum des pectinases se situe entre 45 et 55°C. Ainsi, à une température supérieure à 65 °C, les pectinases sont encore actives, mais rapidement inactivées. Il faut donc trouver un compromis de température.

Mesure de l'efficacité technologique : L'effet le plus marquant et demandé est la clarification des vins thermovinifiés qui peut s'apprécier par la mesure de la turbidité, qui s'exprime en unité de néphélomètrie ou NTU (Nephelemotric Turbidity Unit). Afin d'estimer la bonne action des enzymes, un test "simple" peut-être appliqué : test pectines-glucanes (voir encadré p.21). D'autres paramètres, comme le rendement au pressurage et l'extraction de la couleur peuvent être estimés.

Résultats expérimentaux et autres : Des essais conduits sur des vins de Carignan, ont montré que la turbidité des vins enzymés était trois fois plus faible que celle des autres vins, et que les vins ont été jugés plus ronds, plus fruités, moins amers et moins astringents **[R43]**. Des essais analogues ont été réalisés dans 13 caves du Languedoc-Roussillon de 1997 à 1999 **[R44]**, et ont abouti aux mêmes résultats, en testant deux moments d'incorporation des enzymes (sur raisins, ou après chauffage). Cependant, dans de nombreux cas, les enzymes seules ne peuvent dégrader tous les composés extraits du chauffage des raisins. Il conviendra de les utiliser en synergie avec des clarifiants classiques pour atteindre le niveau de clarification souhaité.

Clarification

Les préparations enzymatiques destinées à la clarification sont souvent décrites dans le même groupe que les enzymes de débourbage bien que leur mode d'action soit différent, puisqu'il n'y a plus de pectines natives dans les vins. La présence d'enzymes dégradant les chaînes latérales et non les zones homogalacturoniques semble être déterminante, mais cela dépend en fait de chaque cas particulier **[R5]**. Il a été montré que l'application des enzymes pectolytiques dans le cadre des opérations préfermentaires facilitait la clarification des vins obtenus, mais certains vins, et plus particulièrement ceux issus de presses rouges, sont très difficiles et longs à clarifier. En effet, si les enzymes endogènes ou exogènes ont pu agir au niveau du vin de goutte, le pressurage a à nouveau extrait des colloïdes des parties solides de la vendange. Aussi est-il utile d'appliquer des enzymes pour aider à la clarification de ces vins de presse, permettre une bonne filtration ultérieure (cf. "L'amélioration de la filtration", p28), et améliorer leur qualité organoleptique.

L'amélioration des qualités olfactives et gustatives

La libération des arômes

Objectifs : Les préparations commerciales dites "d'expression aromatique" renferment des glycosidases capables de libérer les arômes liés.

Mise en œuvre : Il est recommandé d'appliquer les préparations enzymatiques dites libératrices d'arômes, après les fermentations, et de ne pas utiliser de bentonite. La durée d'action des enzymes dépend du produit souhaité, et ainsi, lorsqu'on veut stopper leur activité, il est recommandé d'ajouter de la bentonite pour éliminer les enzymes **[R45]**.

Mesure de l'efficacité technologique : Le suivi par la dégustation est sans doute le critère le plus pertinent ; il est également possible de réaliser des analyses de composés aromatiques. Ces dernières nécessitent une connaissance et/ou une expertise concernant le choix des composés à doser, qui généralement dépend des cépages étudiés.

Résultats expérimentaux et autres : De nombreux travaux ont déjà été réalisés et plus particulièrement sur des cépages muscatés (Muscat, Muscadelle, Gewürztraminer,..) dont la composition variétale de l'arôme primaire est constituée par des terpènes. Ces derniers sont aussi présents à des concentrations bien plus faibles, dans d'autres cépages blancs (Sauvignon, Sémillon, Riesling, Chardonnay,… mais aussi dans quelques cépages rouges). Les travaux de *Guérin et al*, 2009 **[R25]**, ont permis de montrer la spécificité des activités enzymatiques de ces préparations. Cependant, l'utilisation de ces enzymes doit être pilotée, afin que le profil sensoriel recherché sur les vins ne soit pas "exubérant". De plus, des travaux de laboratoire sur des glycosides de Chardonnay et de Gewurztraminer ont montré que dans des conditions optimales de température, de pH, de teneurs en alcool et de SO_2, les glycosidases hydrolysent leur substrat. Cependant, dans les conditions de vinifications, les rendements d'hydrolyse sont beaucoup plus faibles, et peuvent expliquer l'absence de résultats (en fonction du cépage, millésime). Dans tous les cas, même si l'analyse des composés aromatiques ne révèle pas des concentrations plus importantes d'arômes libres, les profils sensoriels des vins résultants, eux, s'en trouvent modifiés **[R29]**.

L'élevage sur lies

Le bénéfice de l'élevage sur lies sur la qualité des vins finis, a fait l'objet de nombreux travaux **[R46 ; R47 ; R48]**.

Objectifs : Les enzymes intracellulaires des levures permettent de lyser la paroi de ces dernières, lors de leur phase de déclin. Cette autolyse libère les constituants intracellulaires (acides aminés, peptides, nucléotides, polysaccharides,…) qui, en quantité importante, permettent l'obtention de vins essentiellement plus ronds en bouche. Afin d'accélérer ce processus, des préparations à base essentiellement de glucanases (β 1-3 et 1-6) sont utilisées.

Mise en œuvre : Application dès la fin de la fermentation alcoolique sur des lies fines et/ou grossières.

Mesure de l'efficacité technologique : La dégustation reste le meilleur critère d'appréciation. Des mesures de polysaccharides (totaux, acides ou neutres) sont envisageables et permettent d'apprécier l'action des enzymes.

Résultats expérimentaux et autres : L'utilisation de ces préparations enzymatiques est réservée aux vins blancs, mais l'application sur vins rouges se développe. Ces préparations permettent d'accélérer le phénomène d'autolyse des levures, mais permettent également d'améliorer la clarification et la filtrabilité des vins après traitement **[R49]**.

L'amélioration de la filtration

Cette étape est l'une des plus importantes, mais la plus délicate, compte-tenu de la présence d'une matrice colloïdale complexe. Malgré les différentes opérations de clarification au cours de l'élevage, des colloïdes protecteurs peuvent être encore présents et gêner la filtration.

Objectifs : L'augmentation de la filtrabilité des vins, requiert l'utilisation de préparations d'enzymes à activités pectolytiques et riches en β-glucanases dégradant les pectines et autres colloïdes responsables du colmatage des membranes de filtration (macromolécules protéiques et polysaccharidiques, glucanes de *Botrytis cinerea* éventuellement, micro-organismes…).

Mise en œuvre : En fin de fermentation alcoolique.

Mesure de l'efficacité technologique : Il est possible d'estimer la filtrabilité des vins, par un indice appelé Vmax et/ou IC pour indice de colmatage et/ou CFLA (Critères de Filtration Lamothe Abiet) ; le principe réside à mesurer le temps de filtration d'un volume donné et/ou de mesurer le volume filtré sur un même temps **[R50 ; R51]**.

Résultats expérimentaux et bibliographiques : L'ajout de préparations commerciales permet de doubler le volume de vin pouvant être filtré avant colmatage. La réduction des coûts de filtration compense ainsi le coût des enzymes (0,8 euros/hl) **[R52]**. Il est important de rappeler que lors de l'ajout de préparations pectolytiques au cours des opérations préfermentaires, ces dernières permettent une amélioration de la clarification et de la filtrabilité des vins résultants. Les vins issus de raisins botrytisés, nécessitent l'utilisation de préparations enzymatiques concentrées en β-1,3-1,6 glucanases, afin d'hydrolyser les glucanes de *Botrytis cinerea*. De même, les vins issus de process œnologiques dégradant partiellement les polysaccharides de raisins, tels que la thermovinification, présentent systématiquement de grosses difficultés de clarification et de filtration et doivent impérativement être enzymés.

Quels sont les facteurs ou intrants œnologiques influençant l'activité enzymatique ?

La température : lorsque la température dépasse les 60°C, les enzymes sont dénaturées. Si la température est trop basse (en dessous de 5°C), l'enzyme n'est pas assez active. Les températures optimales des enzymes utilisées en œnologie sont en général comprises entre 30 et 60°C.

Le pH : la quasi-totalité des enzymes œnologiques est active à des pH compris entre 2,8 et 5,0. Le pH optimum de ces enzymes est compris entre 3 et 6,5.

Les sulfites : l'activité enzymatique est inhibée par le SO_2 libre. Cependant, l'inhibition n'intervient qu'au-delà de 500 mg/l. Par précaution, il peut s'avérer nécessaire de décaler dans le temps l'ajout de ces deux produits.

La bentonite : un léger collage à la bentonite (5-10 g/hl) peut stopper l'action d'une enzyme.

Les tanins œnologiques : des travaux ont montré que les tanins s'associaient avec les protéines par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes. Il pourrait être entendu qu'une telle association pourrait exister avec les enzymes contenues dans les préparations enzymatiques.
La dose : la dose d'utilisation correcte d'une enzyme est à rationnaliser en fonction de la quantité de substrat à dégrader, du temps imparti pour obtenir l'action souhaitée, et de la température. L'action des enzymes à basse température peut être compensée par une augmentation de leur dose d'emploi (pour une même durée d'action) et inversement pour les faibles doses d'enzymes, pouvant être compensées par une augmentation de la température et du temps d'action.

Conclusion et perspectives

Les enzymes sont des outils issus des Biotechnologies, dont l'intérêt et l'efficacité sont démontrés. Cependant, leur utilisation n'est pas suffisamment développée, ceci étant probablement dû à une mauvaise maîtrise de l'outil qui limite l'obtention de résultats plus probants que certaines opérations dites classiques.
Dans certains cas, les résultats ne se mesurent pas en volumes et/ou en qualité de produits finis, mais en gain de frigories, de consommation électrique et productivité.
Afin d'accompagner le développement de cet outil, l'IFV s'engage dans un nouveau programme sur l'utilisation des préparations libératrices d'arômes et sur une connaissance plus approfondie de l'action des préparations dites pectolytiques sur les polysaccharides des raisins.

Bibliographie

R5. Flanzy C. 1998. Œnologie - Fondements scientifiques et technologiques. *Ed. Tec & Doc Lavoisier*, 376-393.

R25. Guerin L., Sutter D.H., Demois A., Chereau M., et Trandafir G. 2009. Enzymes in winemaking determination and comparison of enzymatic profiles of the main commercial preparations, AJEV, (60:3), 322-331.

R26. Cayla L., Cottereau P., Masson G., Guérin L. 2009. Les enzymes en œnologie ; 1er volet : Intérêt dans les opérations préfermentaires sur vin rosé. Revue Française d'œnologie, 234, Cahier Technique p2-9.

R27. Guerin L., Chatelet B., Anneraud C., Vinsonneau E., Davaud F., Solanet D., et Vuchot P. 2011. Les enzymes en œnologie- 2ème volet : Intérêt dans les opérations fermentaires sur vin rouge. Revue française d'œnologie, n° 244. Cahier Technique p7-18.

R28. Guerin L., Beguin J., Charrier F., Meistermann E., Crachereau J-C., Schneider R. 2013. Les enzymes en œnologie – 3ème volet : Intérêt dans les opérations préfermentaires sur vin blanc. Revue française d'œnologie, n°256. Cahier technique p2-12.

R29. Guerin L., Beguin J., Cayla L., Charrier F., Meistermann E., Schneider R., Gerbaux V., Briffox C., Crachereau J-C. Les enzymes en œnologie : 4ème Volet : Intérêt dans les opérations post-fermentaires sur vins blanc et rosé. Revue française d'œnologie. 2014.

R30. Guérin-Schneider R., et al. Les vins blancs : de la démarche marketing à la vinification. Ed. France Agricole. 2013.

R31. Fernandez O., Bajard-Sparrow C., Fauveau C., et Pellerin P. 2005. Optimisation des étapes préfermentaires des vendanges blanches avec une formulation enzymatique adaptée. Bilan des essais réalisés en France au cours de la campagne de vinification 2004. *Revue des Œnologues*, 116 : 29-31.

R32. Geoffroy O. 2010. Influence de l'utilisation d'enzymes de macération sur la teneur en thiols variétaux dans les vins de Sauvignon blanc. Publications site IFV Sud-Ouest.

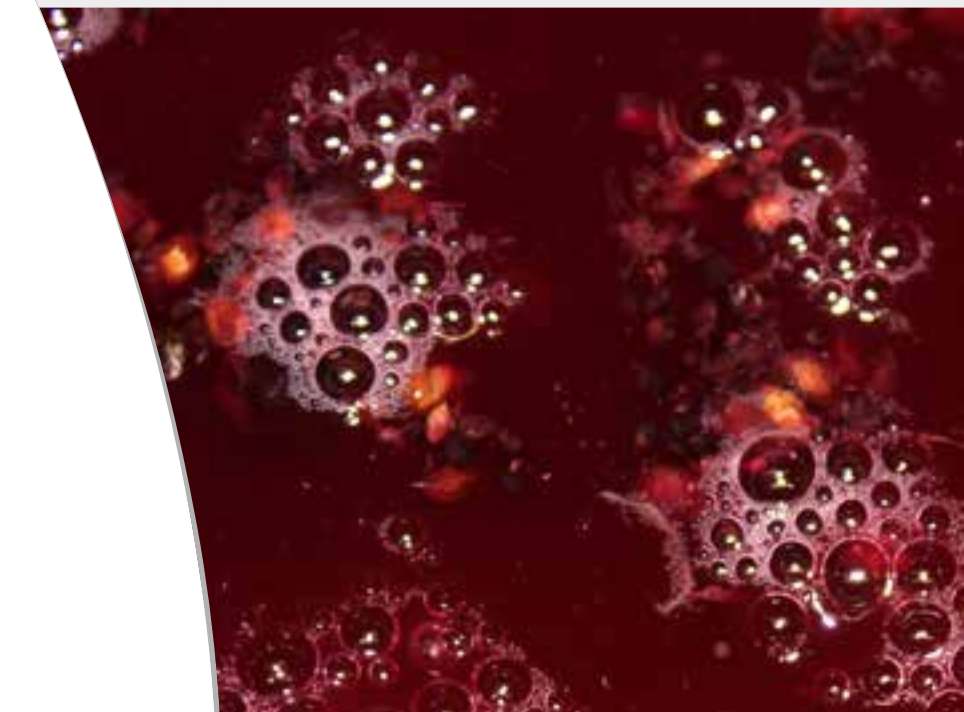
R33. Canal-Llaubères RM. 2010. Managing wine quality : oenology and wine quality – chapitre 4 : enzymes and wine quality. 93-132. Woodhead publishing limited.

R34. Guerrand D., Gervais J.P. 2001. Impact d'une nouvelle préparation de pectinases sur l'extraction des composés intra-cellulaires au cours de la macération des raisins rouges. Revue française d'œnologie, 190 : 12-15.

R35. Canal-Llaubères R.M., Pouns J.P. 2002. Les enzymes de macération en vinification en rouge. Influence d'une nouvelle préparation sur la composition des vins. Revue des œnologues, 104 : 23-31.

R36. Glories Y. 1984. La couleur des vins rouges. Les équilibres des anthocyanes et des tannins. *Connaissance Vigne et Vin*, 18 : 253-271.

R37. Le Traon M.P., Pellerin P. 1998. Purification and characterization of two -D-glucosidases from Aspergillus niger enzyme preparation : affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing fruits. *Enzyme Microb. Technol.*, 22(5) : 374-382.



R38. Ducasse M.A., Wiliams P., Meudec E., Cheynier V., Doco T. 2010. Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. Carbohydrate polymers. 79, 747-754.

R39. Barbe C. 1995. Recherche sur les activités estérases contaminantes des préparations pectolytiques. *Thèse Université Bordeaux II*, 112p.

R40. Gerbaux V., Vincent B., Bertrand A. 2002. Influence of Maceration Temperature and Enzymes on the Content of Volatile Phenols in Pinot noir Wines. *Am. J. Enol. Vitc*. 53(2) : 131 – 137.

R41. Benito S., Palomero F., Morata A., Uthurry C., Suarez-Lepe J.-A. 2009. Minimization of ethylphenol precursors in red wine via the formation of pyranoanthocyanins by selected yeasts. International Journal of Food Microbiology 132, 145-152.

R42. Morata A., Vejerano R., Ridolfi G., Benito S., Palomero F, Uthurry C., Tesfaye W., Gonzalez C., Suarez-Lepe J.-A. 2013. Reduction of 4-ethylphenol production in red wines using HCDC+ yeasts and cinnamyl esterases. Enzyme and microbiological Technology 52, 99-104.

R43. Aliot L., Blateyron L., et Olivier B., 2008. Thermovinification et turbidité : quel impact sur le fruité. Rev. Oen. Bourgogne. 129. 38-40.

R44. Wantz S., Bajard C., Fauveau C., Pellerin P. 2000. Vers une utilisation optimale des enzymes œnologiques en thermovinification. *Revue française d'œnologie*, n°184.

R45. Canal-Llauberes R.M. 2013. Les enzymes et l'extraction des arômes. Revue des œnologues. N°149.

R46. Feuillat M., and Charpentier C. 1982. Autolysis of yeast in Champagne. Am. J. Enol. Vitic. 33, 6-13

R47. Babayan TL., and Bezrukov MG. 1985. Autolysis in yeast. Acta Biotechnologia 2, 129-126.

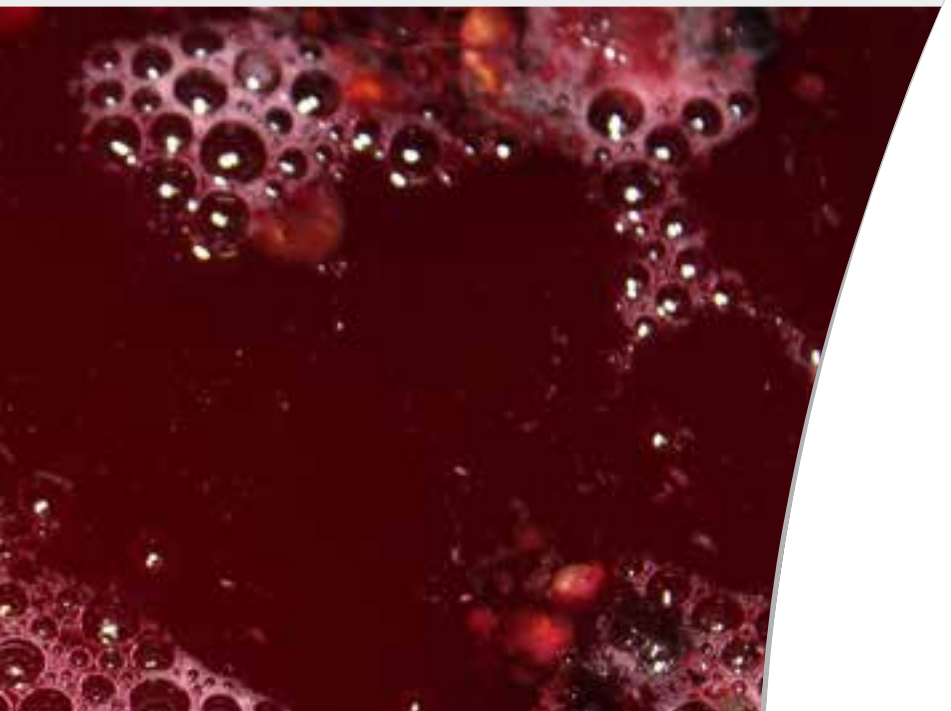
R48. Llaubères R-M., Dubourdieu D., et Villettaz J.C. 1987. Exocellular polysaccharides from Saccharomyces in wine. J. Sci. Food Agric., 41, 277–286.

R49. Vuchot P. 2001. Contribution à la connaissance des conséquences de l'élevage sur lies sur la composition polysaccharidique des vins. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

R50. Descout J.J., Border J., Laurenty J., Guimberteau G. 1976. Contribution à l'étude des phénomènes de colmatage lors de la filtration des vins sur filtre écran. Connaissance de la Vigne et du Vin 13, n°1, 93-123.

R51. Romat H., Reynou G. 2008. Nouveaux critères de filtration pour la maîtrise œnologique et économique de la filtration. Rhône en V.O. Revue de Viticulture et d'œnologie de la Vallée du Rhône, n°3, 71-76.

R52. Humbert-Goffard A., Basque E., Vatin L., Canal-Llaubères R.M. 2003. Rôle des préparations enzymatiques à base de -glucanases sur la mise au propre et la filtration des vins. *Revue Française d'Œnologie*, 201 : 28-31.



REMERCIEMENTS

Les données présentées sont issues en grande partie des travaux du Groupe National financé par FranceAgriMer (2002-2009) intitulé “Utilisation raisonnée des enzymes en œnologie”.

PARTENAIRES TECHNIQUES :

- **Unités IFV de Beaune, Bordeaux, Colmar, Gaillac, Montpellier, Nantes, Nîmes, Tours, Vidauban**
- **Centre des Rosés, Chambre d’Agriculture de la Gironde, Inter-Rhône.**

EXPERT

- **M. Michel Moutounet (INRA Montpellier).**

PARTENARIATS DÉVELOPPÉS :

- **OIV (sous-commission analytique et spécifications).**
- **Fabricants et formulateurs d’enzymes membres d’Oenoppia (AB Enzymes, Novozymes, DSM - Oenobrands, Erbslöh, Lyven, AEB Spindal), Sofralab et le laboratoire d’analyses Nyséos.**

POUR EN SAVOIR PLUS :

- **Organisation Internationale de la Vin et du Vin (OIV)**
  http://www.oiv.int
- **FranceAgrimer**
  http://www.franceagrimer.fr/
- **Oenoppia**
  http://www.oenoppia.com/
- **Institut Français de la Vigne et du Vin**
  http://www.vignevin.com/

ISBN-2-906417-63-7 - Réalisation : ESOPE – 12/2014

INSTITUT FRANÇAIS
DE LA VIGNE ET DU VIN

ITINÉRAIRES N° 26

Comité de rédaction :
Laurence Guérin (IFV), Sophie Pallas (Oenoppia)

Comité de relecture :
Frédéric Charrier, Marie-Agnès Ducasse (IFV), Jean-Claude Ruf, Jean-Claude Villettaz (OIV), Marie-Madeleine Caillet (UFOE), Michel Moutounet (INRA Montpellier), Armelle Lallement, Rémi Lévêque, Patrice Pellerin (Oenoppia).

Crédits photos :
IFV - Philippe Roy-Grilhet/Inter-Rhône - FOTOLIA