

Les enzymes œnologiques : ce que vous avez toujours voulu savoir sans avoir pensé à le demander...

Céline Fauveau Schaff
Laffort – Bordeaux – France.



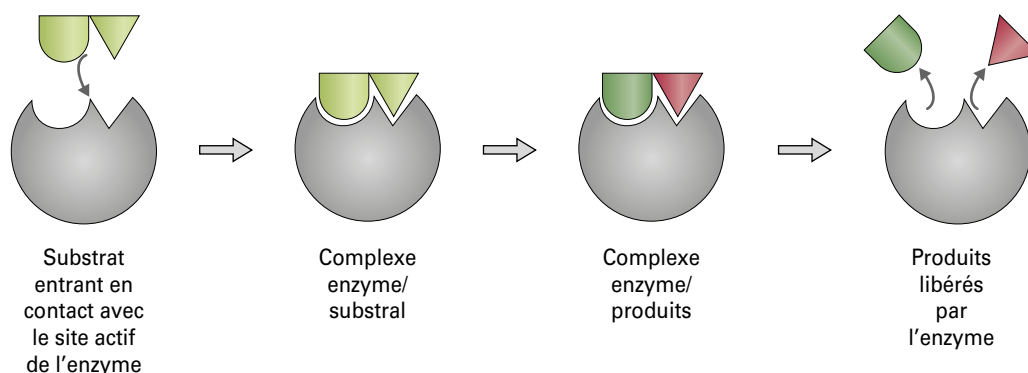
Extrait de la Revue
des Œnologues n° 159
www.oeno.tm.fr

Aujourd'hui, les besoins en vinification et les questions récurrentes sur les méthodes permettant la comparaison des enzymes appellent à une mise à jour des connaissances sur les préparations enzymatiques destinées à l'œnologie. L'objectif de cet article est de fournir des cadres qui permettront d'effectuer des choix éclairés. Dans cette optique, nous aborderons de manière plus complète la composition des préparations enzymatiques utilisées en vinification, tout en gardant à l'esprit que l'enzymologie reste une discipline de haut niveau scientifique de la biologie.

Les limites de la vulgarisation scientifique

Les responsables de vinification, immergés au quotidien dans le sensoriel, accordent beaucoup de valeur à la théorie scientifique, les bénéfices constatés non expliqués étant souvent assimilés à un « discours commercial ». Pour répondre à ce besoin de « sérieux », les formulations enzymatiques complexes sont souvent résumées à la théorie la plus basique de l'enzymologie : une enzyme plus un substrat donne un produit (**figure 1**). Réduites à leur activité pectinase, la plupart des enzymes œnologiques semblent toutes être les mêmes. La compréhension de leur mode d'action est tronquée et le choix dans une offre florissante devient difficile.

■ **Figure 1 : Représentation simplifiée d'une réaction enzymatique.**



Les acheteurs se rabattent alors sur une tentative de rationalisation en comparant des prix/kg ou prix/valeur d'activité...

La complexité des préparations enzymatiques pour l'œnologie

Les enzymes utilisées en œnologie sont en réalité des cocktails multiactivités ayant pour composante enzymatique principale la ou les activités recherchées, mais contenant aussi de très nombreuses activités secondaires.

Les cocktails enzymatiques sont issus du vivant

Ce sont des champignons microscopiques (comme les levures) qui sont les sources productrices d'enzymes pour les industriels. Les enzymes d'intérêt œnologique sont issues principalement de microorganismes appartenant aux espèces *Aspergillus* et *Trichoderma*.

Chacune de ces espèces compte un grand nombre de souches qui présentent des aptitudes différentes pour la production d'enzymes. Chacune produisant un mélange unique d'activités. Par exemple, un champignon utilisé pour la production d'enzymes peut compter plusieurs dizaines de gènes codant pour des enzymes ciblant l'hémicellulose (*Hatsch et al., 2006*). Chaque producteur détient ses propres souches et par conséquent, propose des cocktails uniques. Parmi ces nombreuses enzymes, on compte :

- des endo-enzymes, coupant au hasard de la chaîne et libérant des polymères de taille moyenne (**figure 2**);
- des exo-enzymes attaquant les extrémités et libérant des mono et dimères (**figure 2**);
- mais aussi des enzymes annexes désubstituantes qui « débranchent » les chaînes latérales pour faciliter l'accès des deux premières aux polymères... (**figure 3 A, B**).

Influence du milieu de culture

Une étude a permis de montrer la forte influence du milieu de culture sur la transcription de plusieurs gènes codant pour la production d'enzymes. Par exemple, en présence de xylane (un composant de l'hémicellulose – *T. Doco, P. Williams, M. Pauly, M.A. O'Neill, P. Pellerin 2003*), jusqu'à 30 xylanases peuvent être exprimées concomitamment : endoxylanase, xylosidase, arabinofuranosidase, acétylxylane estérase, β -galactosidase, féruloyl estérase... L'impact de la plupart de ces activités en vinification reste à étudier.

Pour la production de pectinases, il en va de même. Le champignon est capable de mobiliser un véritable arsenal enzymatique quand il est mis en présence d'un substrat précis. Cet arsenal spécifique à chaque souche est utilisé par le champignon dans la nature au cours de l'infection du végétal, pour dégrader des

molécules complexes comme les polysaccharides pectiques et pénétrer la plante.

Les activités enzymatiques principales des préparations pour l'œnologie

La dégradation de la paroi pectocellulosique: une chaîne de réactions enzymatiques

La composition de la pectine varie en fonction du cépage et, pour un même cépage, en fonction de son stade de développement. Par exemple, les pectines de raisins sont en moyenne méthylées à 70 %. Le degré de méthylation étant inversement proportionnel à la rigidité de la pectine, il varie en fonction du niveau de maturité et du cépage.

Compte tenu de la diversité des substrats qui constituent la paroi végétale, la synergie d'action des diverses enzymes est primordiale pour assurer une hydrolyse suffisante des complexes polysaccharidiques. Si on prend l'exemple simple de la polygalacturonase (PG), elle n'hydrolyse la chaîne de pectine qu'en des endroits déméthylés par la pectine-méthylesterase (PME). Les activités secondaires comme les arabanases, galactanases ou encore les rhamnogalacturonases, en enlevant les grosses chaînes latérales, libèrent dans le milieu des polysaccharides complexes et « désencombrent le chantier » pour permettre l'accès et accélérer le travail des autres pectinases (*figure 3 B*).

Les activités secondaires indésirables

Il arrive que dans le cocktail enzymatique soient produites des activités ayant une action indésirable en vinification. C'est le cas de la cinnamoyl estérase, activité anciennement connue sous le nom de cinnamyl estérase (CE), parfois encore appelée depsidase ou tannase. Le mécanisme d'hydrolyse conduisant à la formation des vinyl phénols, composés odorants indésirables en vinification en blanc, a été identifié par Chatonnet et *al.*, (1992) puis confirmé par Dugelay et *al.*, (1993). En connaissance de cause, Laffort® propose des cocktails enzymatiques purifiés maîtrisant l'impact sur la qualité des vins.

Les activités secondaires, venant en support de l'activité principale

Ces activités dites secondaires, produites par le microorganisme au cours du cycle de production de l'activité principale, peuvent jouer un rôle important en vinification. Elles peuvent venir en support du bénéfice recherché comme certaines cellulases ou hémicellulases. Elles peuvent aussi être essentielles: leur absence étant limitante pour la dégradation des polysaccharides. Lorsqu'elles font défaut, une enzyme très concentrée (en une seule activité) peut être inefficace car dans l'impossibilité d'accéder à son substrat.

Les activités secondaires apportant un bénéfice collatéral

On trouve aussi dans le cocktail, des enzymes dont le bénéfice est identifié de manière empirique. Ces bénéfices, généralement organoleptiques, sont souvent à l'origine de l'attachement des utilisateurs à une préparation enzymatique particulière.

La *figure 4* illustre la préférence des vins rouges enzymés. Ce choix quasiment systématique pour les vins enzymés porte aussi bien sur des critères de qualité globale que d'augmentation de volume en bouche ou encore de qualité phénolique.

Un bénéfice organoleptique démontré

Trop souvent, lorsque les observations échappent à l'évidence d'une théorie scientifique, on confond « l'inexpliqué » avec « l'inexplicable » et on met les faits en doute. Par opposition, l'approche empirique va du concret à la théorie. Elle considère que la connaissance se fonde sur l'accumulation de faits et d'observations. Cette méthodologie requiert de la rigueur et une grande confiance en notre aptitude à juger.

L'impact des enzymes sur le volume en bouche des vins rouges

Malgré des années d'observation par des panels de dégustation du monde entier, l'impact positif de Lafase® He Grand Cru sur le volume en bouche

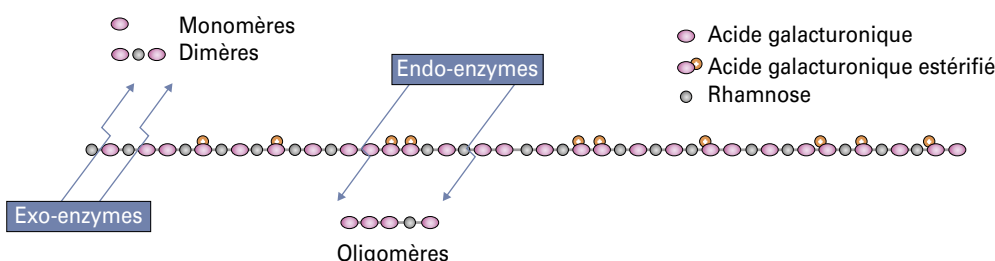
des vins rouges restait pour beaucoup du domaine de l'argumentaire commercial, interprétation réductrice, limitant l'action de l'enzyme aux bénéfices plus visibles d'extraction de couleur et de tanins. Les travaux de thèse de Marie Agnès Ducasse publiés dans le « *Journal of Agricultural and Food Chemistry* » (2011.059.6558-6567) démontrent l'impact positif de l'enzymage et du type d'enzyme utilisé sur la composition du vin en polysaccharides (*figure 5*).

En effet, ces travaux mettent en évidence non seulement des différences de composition polysaccharidique entre les vins enzymés et les témoins, mais aussi des différences en fonction des activités enzymatiques présentes dans les préparations utilisées pour la macération/extraction.

En règle générale, l'utilisation de pectinases entraîne une diminution des PRAGS et l'absence de résidus d'homogalacturonanes (HG). Les vins ainsi enzymés présentent une meilleure limpidité et des rendements de filtration supérieurs. Grâce à une activité RGIIase, Lafase® He Grand Cru permet la libération dans les vins du RGII, polysaccharide complexe non dégradé enzymatiquement. La forte présence de RGII, peut expliquer la supériorité organoleptique des vins (*figure 4*).

La variabilité des modes d'action et sites de clivage des pectinases présentes dans les préparations commerciales conduit à la libération dans le vin de polysaccharides structurellement différents. Outre les implications technologiques visibles comme des différences de viscosité, ces polysaccharides issus des différents modes de dégradation des chaînes de pectines ont potentiellement un impact différent sur les sensations en bouche, voire sur la stabilité colloïdale du vin.

■ **Figure 2: Représentation de l'action des endo et exo-enzymes.**



Comment comparer l'offre

Que ce soit pour une application de clarification, de macération ou encore de filtrabilité, une préparation enzymatique œnologique doit posséder un arsenal enzymatique très diversifié pour hydrolyser l'ensemble des liaisons des différentes structures de la pectine. Cependant, bien que les préparations enzymatiques du commerce soient formulées pour posséder l'ensemble des activités nécessaires à l'obtention du résultat promis, nous devons garder à l'esprit que toutes les activités présentes dans une préparation ne sont pas caractérisées.

Les deux types d'unités de mesure de l'activité enzymatique

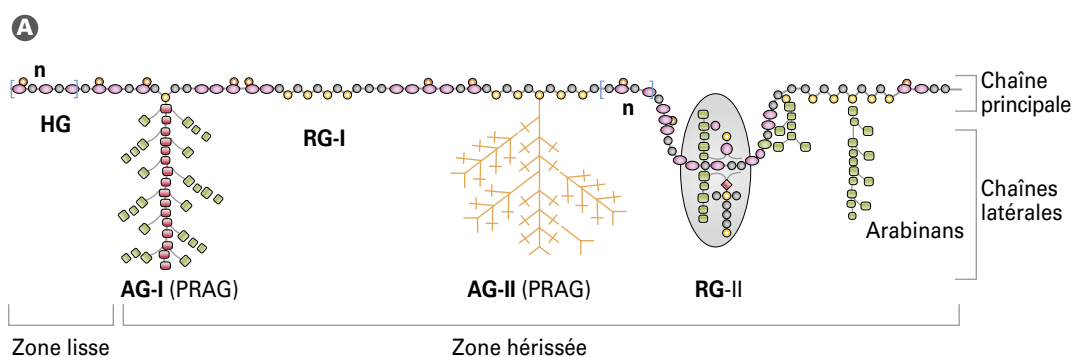
Les unités de mesure globales ou unités arbitraires des fabricants

Ces unités sont des outils utilisés par les industriels pour la standardisation (FDU, AVJP...). Elles mesurent les performances synergétiques des différentes activités du cocktail enzymatique sur la diminution de viscosité d'une solution modèle de pectine. Cependant, les mesures sont effectuées sur des solutions de pectine de pomme et ne sont par conséquent ni représentatives de la pectine de raisin (par leur degré de méthylation) ni des conditions œnologiques de pH et température (**encadré 1**).

Les unités mesurant l'activité d'une seule enzyme

– le Katal (unité internationale SI) représente la quantité d'enzyme transformant 1 mole de substrat par seconde. Les activités des enzymes sont données en nano Katal (nKat);
 – l'activité spécifique: activité catalytique par unité de masse de protéine (I.U./mg d'enzyme solide). BGU pour la beta glucosidase, PGNU pour la polygalacturonase (**encadré 2**)...

Figure 3: A) Représentation schématique simplifiée des diverses zones d'une chaîne de pectine. B) Principales activités enzymatiques entrant dans la séquence de réaction de dépectinisation.



HG = Homogalacturonane – **RG-I** et **II** = Rhamnogalacturonanes – **AG-I** et **II** = Arabinogalactanes
PRAG = Les polysaccharides riches en arabinose et galactose

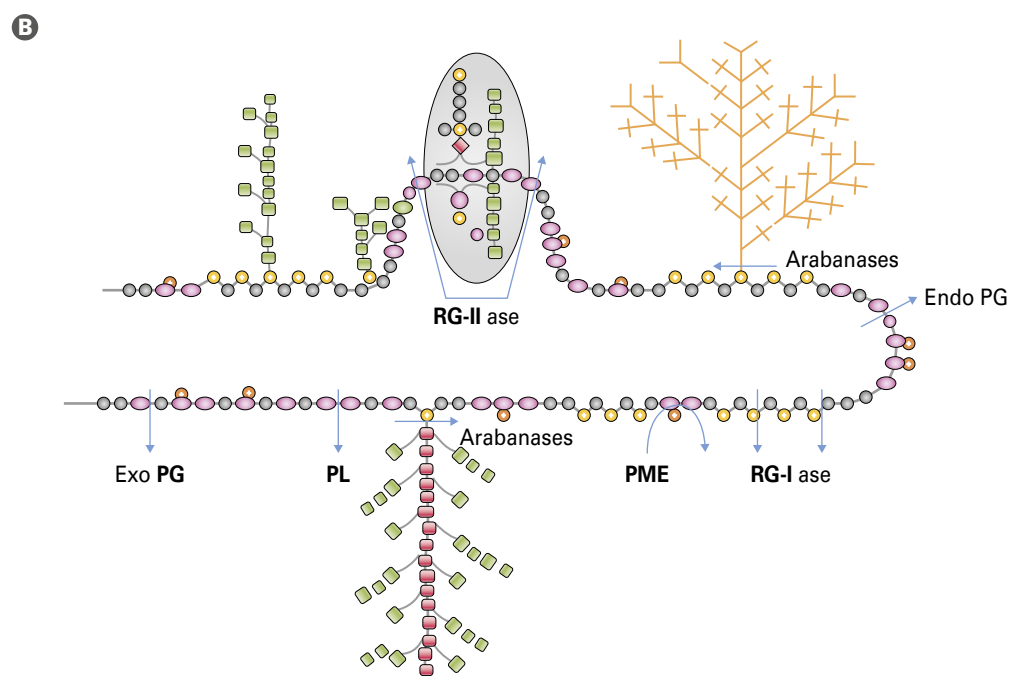


Figure 4: Impact organoleptique des enzymes de vinification en rouge – 2014. Préférence sensorielle par un jury de 19 professionnels.

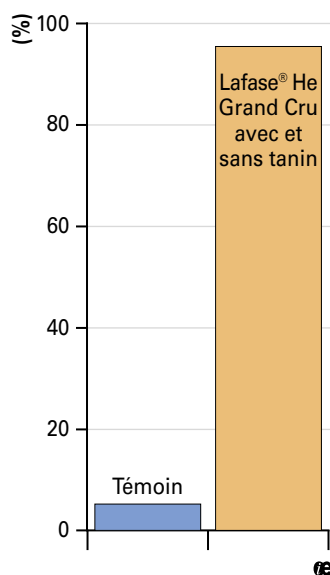
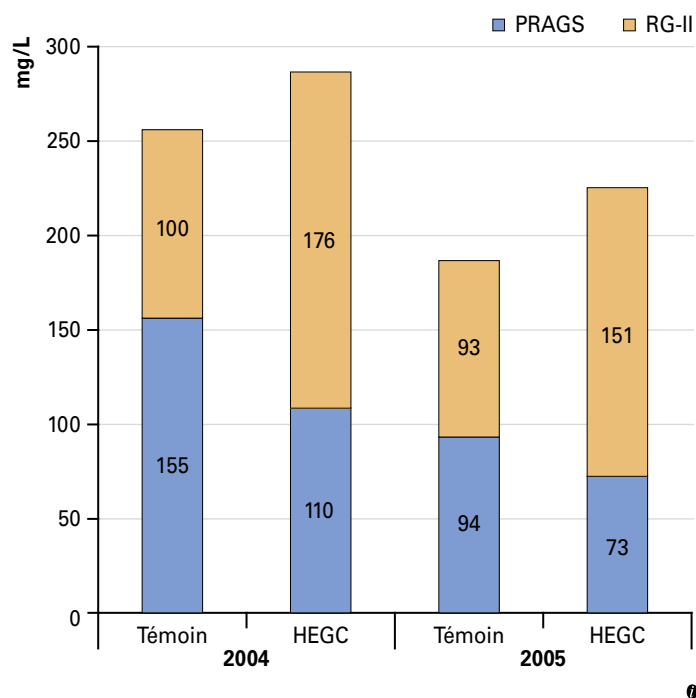


Figure 5: Impact des enzymes sur la composition polysaccharidique des vins rouges.



Pour comparer, faites des essais !

Comme de nombreux aspects de la vinification, l'utilisation des enzymes est une science mais surtout une synthèse de résultats analytiques, d'observations, d'analyse sensorielle et d'expérience. C'est pour cela qu'après avoir présélectionné des formulations sur la base des connaissances scientifiques, le développement d'une nouvelle enzyme passe systématiquement par une phase d'expérimentation. Cette phase d'essai est aussi nécessaire en cave pour comparer les performances de plusieurs préparations enzymatiques. Outre l'approche novatrice de l'impact du mode de dégradation de la pectine sur les propriétés physico-chimiques et organoleptiques du vin, il est aussi important de comparer en conditions réelles les performances des enzymes en fonction des doses, températures et temps de contact. Une étude de coût de traitement pourra aussi être effectuée.

Conclusion

Les formulations enzymatiques disponibles aujourd'hui pour l'œnologie sont soumises à une législation stricte et bien qu'un certain nombre d'autres activités soient autorisées (beta-glycosidases et beta-glucanases), cet article traite en particulier des pectinases, de leur diversité et de l'arsenal d'activités secondaires qui les accompagne et assure leur efficacité.

Les catalogues de produits de vinification ne proposent pas « une pectinase » mais de nombreux cocktails de pectinases. Ces pectinases diffèrent par leur pH, température optimale mais aussi par leur mode d'action. Elles sont accompagnées d'une myriade d'autres activités. Chaque préparation conduisant à un itinéraire unique



Test pectine et essai comparatif de différentes formulations enzymatiques.

de dégradation de la molécule de pectine. Les différences de composition des moûts et des vins résultant de l'utilisation de l'une ou l'autre préparation ayant pour conséquence des variations technologiques et organoleptiques significatives.

Pour effectuer un choix avisé et continuer à faire avancer la connaissance, les opérateurs et responsables de vinification jouent un rôle primordial dans la réalisation d'essais, et le partage des résultats techniques et sensoriels. ■

■ Encadré 1 :

Les unités arbitraires des producteurs ne sont pas corrélées entre elles.

Une valeur élevée d'une unité arbitraire n'est pas forcément un gage d'efficacité œnologique. ■

■ Encadré 2 :

Deux produits ayant un même niveau d'activité exprimé dans une unité donnée, pourront avoir des comportements technologiques très différents. On parle d'isoenzymes : même enzyme, mais plages de pH et de température optimaux différentes.

Les enzymes œnologiques sont des cocktails. Chaque activité agit en synergie avec les autres pour atteindre l'objectif.

Certaines activités dites principales sont connues et standardisées ; d'autres dites secondaires ou auxiliaires peuvent être connues et mesurées mais non standardisées, et enfin, il existe un pool d'activités non identifiées (actives ou non en conditions œnologiques).

Un niveau élevé d'une seule activité peut être superflu si l'action de l'enzyme est limitée par l'absence des « activités auxiliaires » partenaires limitant l'accès à son substrat. ■



Article publié avec l'aimable autorisation de la Revue des Œnologues

N° 159 Avril 2016 – pages 30 à 33

"Les enzymes œnologiques : ce que vous avez toujours voulu savoir sans avoir pensé à le de-

mander..." – Céline Fauveau Schaff

La référence internationale de l'actualité scientifique et technique vitivinicole, depuis plus de 44 ans en France et dans 60 pays.

■ Plus de 1 200 articles archivés par mots clés www.oeno.tm.fr

■ Pour tout contact : infos@mail.oeno.tm.fr ■

La pureté aromatique avec :

ZYMAFLORE® XPURE

- Très faible production de composés soufrés négatifs et de composés combinant le SO₂
- Permet de diminuer la perception du caractère végétal.
- Favorise la fraîcheur aromatique et l'expression de fruits noirs.

CS 61 611 - 33072 BORDEAUX CEDEX - Tél. : +33 (0)5 56 86 53 04 - www.laffort.com