



HAL
open science

Actes scientifiques de la 10ème Journée Scientifique Vigne et Vin (JSVV)

Agnès Ageorges, Bruno Blondin, Jean-Marie Sablayrolles

► **To cite this version:**

Agnès Ageorges, Bruno Blondin, Jean-Marie Sablayrolles. Actes scientifiques de la 10ème Journée Scientifique Vigne et Vin (JSVV). Quelles avancées récentes pour l'œnologie?, 2018, 10.17180/csxx-cc27. hal-04540594

HAL Id: hal-04540594

<https://hal.inrae.fr/hal-04540594v1>

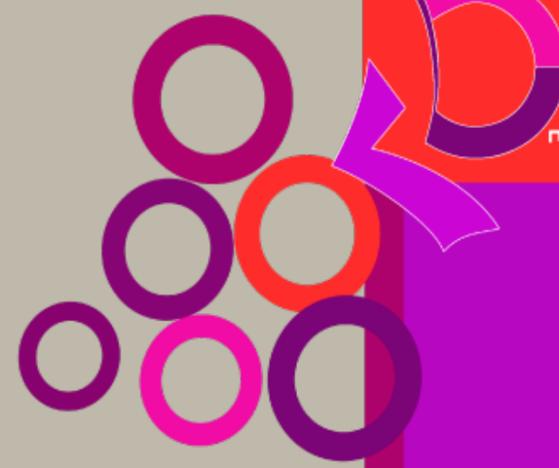
Submitted on 10 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



JOURNÉE SCIENTIFIQUE VIGNE - VIN



Mercredi 21 mars 2018
Montpellier

Quelles avancées récentes pour l'œnologie ?

Contact : jsvv10@inra.fr

INRA UMR SPO
Campus de la Gaillarde - Bât 28
2 place Pierre Viala
34060 Montpellier cedex2

organisée par

- l'unité mixte de recherches Sciences Pour l'Œnologie
- l'Institut des Hautes Études de la Vigne et du Vin (IHEV)



Édito

L'Unité Mixte de Recherches Sciences Pour l'Œnologie (UMR SPO) et l'Institut des Hautes Etudes de la Vigne et du Vin (IHEV) vous proposent de découvrir des avancées récentes de la recherche dans le secteur viti-vinicole sur le campus Montpellier SupAgro.

Pour cette 10^{ème} édition, l'œnologie sera au cœur des sujets abordés. Le programme se décline autour de 3 sessions : une 1^{ère} session traitant de la diversité et l'aspect nutritionnel des levures œnologiques ; une 2^{ème} session sur l'amertume des vins ; et une 3^{ème} session dans laquelle seront présentés les avancées et nouveaux outils pour une meilleure maîtrise de la qualité des vins. Nous avons privilégié des interventions courtes et synthétiques afin d'offrir aux participants une vision la plus large possible des sujets de recherche actuels. Cette formule laisse une place importante pour la discussion, et pour les remarques et suggestions des professionnels de la filière.

En espérant que cette journée du 21 Mars 2018 soit riche d'échanges et d'enseignements.

Bruno Blondin

Directeur de l'IHEV

Jean-Marie Sablayrolles

Directeur de l'UMR SPO

Coordinatrice scientifique : Agnès Ageorges, INRA, UMR SPO

Comité d'Organisation

Agnès Ageorges, INRA, UMR SPO

Bruno Blondin, Montpellier SupAgro, IHEV

Catherine Chabalière, INRA, UMR SPO

Véronique Cheynier, INRA, UMR SPO

Agnès Masquin, INRA, UMR SPO

Didier Ollé, Montpellier SupAgro, IHEV

Philippe Polizzi, INRA, UMR SPO

Sabine Ragusi, Montpellier SupAgro, IHEV

Jean-Marie Sablayrolles, INRA, UMR SPO

Jean-Michel Salmon, INRA, UE Pech-Rouge

Cédric Saucier, UM, UMR SPO

Aude Vernhet, Montpellier SupAgro, UMR SPO

Avec l'appui de :

Lisbeth Michel (Infographie, site web)



Sommaire

- Les levures non-*Saccharomyces* : un potentiel à exploiter en œnologie** p. 1
Seguinot P.¹, Rollero S.², Englezos V.³, Ortiz-Julien A.⁴, Guillamon J-M⁵, Divol B.², Bloem A.¹, Camarasa C.¹
¹UMR SPO, INRA; ²IWBT, Stellenbosch University; ³DISAFA, Turin University; ⁴Lallemand; ⁵Valencia University
- Que savons-nous de plus sur la diversité des levures *Saccharomyces cerevisiae* en œnologie ?** p. 7
Legras J-L
UMR SPO, INRA Montpellier
- La mortalité des levures en fermentation alcoolique : le rôle clé des limitations en micronutriments et de l'azote** p. 13
Blondin B.¹, Duc C.^{1,2}, Pradal M.¹, Noble J.², Tesnière C.¹
¹UMR SPO, INRA, Montpellier SupAgro; ²Lallemand
- Effet des lipides des bourbes sur la conduite des fermentations et la viabilité des levures** p. 17
Tesnière C.¹, Casalta E.¹, Girardi-Piva G.¹, Pradal M.¹, Vernhet A.¹, Sablayrolles J-M¹, Salmon J-M²
¹INRA-UMR SPO; ²INRA UE Pech Rouge
- De la perception de l'amertume à l'amertume des vins** p.21
Samson A.¹, Leriche C.¹, Bégué C.¹, Fabre C.¹, Caillé S.²
¹UE Pech Rouge, INRA; ²UMR SPO, INRA
- Acquisitions récentes sur l'amertume des vins rouges : contribution des composés libérés par le bois de chêne** p. 27
Marchal A., Cretin B., Sindt L., Gammacurta M., Waffo-Téguo P., Dubourdieu D.
Univ. Bordeaux, ISVV; INRA, ISVV
- Etude des facteurs influençant l'amertume des vins blancs par l'analyse sensorielle** p. 35
Caillé S.¹, Chabalière C.¹, Samson A.^{1,2}
¹UMR SPO, INRA; ²UE Pech-Rouge, INRA
- Intérêt de l'utilisation des dérivés de levure en œnologie** p. 41
Mekoue Nguela J.¹, Sieczkowski N.¹, Poncet-Legrand C.², Roi S.², Brillouet J-M², Vernhet A.²
¹Lallemand; ²UMR SPO, INRA
- Les laccases de *Botrytis cinerea* : Structures, activités, effet souche et inhibitions par des extraits polyphénoliques** p. 47
Saucier C.¹, Quijada Morín N.¹, Garcia F.¹, Sauvage F-X, Lambert K.², Walker A-S³, Viaud M.³, Tiers L.⁴, Hirtz C.⁴, Iturmendi N.⁵, Moine V.⁵
¹UMR SPO, Université Montpellier; ²PHYMEDEXP, Univ Montpellier; ³UMR BIOGER, AgroParisTech; ⁴LBPC-IRMB, CHU Montpellier; ⁵Biolaflort
- Risques associés à l'activité Polyphénol Oxydase (PPO) et vinification bas intrants** p. 51
Sire Y., Remise E., Samson A., Moutounet M., Salmon J-M
UE Pech Rouge, INRA
- L'UMT Minicave : outil de multi-vinifications en petit volume** p. 57
Ducasse M-A¹, Aguera E.²
¹Institut Français de la Vigne et du Vin; ²UE Pech Rouge, INRA

Les levures non-*Saccharomyces* : un potentiel à exploiter en œnologie

Pauline Seguinot¹, Stéphanie Rollero², Vasileios Englezos³, Anne Ortiz-Julien⁴, José-Manuel Guillamon⁵, Benoit Divol², Audrey Bloem¹, Carole Camarasa¹

¹INRA, UMR-SPO

²IWBT, Stellenbosch University

³DISAFA, Turin University

⁴Lallemand

⁵IATA, Valencia University

Introduction

Ces 50 dernières années, la pratique du levurage, c'est-à-dire l'ensemencement des moûts de raisin par des souches de *Saccharomyces cerevisiae*, sélectionnées sur la base de traits d'intérêt technologique, s'est largement répandue dans la filière œnologique pour contrôler l'étape de fermentation alcoolique. C'est en effet le procédé le plus approprié pour s'assurer du bon déroulement de la fermentation et éviter la formation de défauts d'arôme. Dans ces conditions, les souches de *S. cerevisiae* ensemencées supplantent rapidement les espèces non-*Saccharomyces* de la flore indigène des jus de raisin. Ce phénomène est principalement lié au manque d'adaptation aux limitations en oxygène et aux concentrations croissantes en éthanol du milieu des levures non conventionnelles. De ce fait, elles sont incapables de mener la fermentation œnologique jusqu'à épuisement des sucres et ont longtemps été considérées comme des microorganismes d'altération.

Il existe actuellement un regain d'intérêt vis-à-vis de ces espèces, dont le potentiel pour améliorer la qualité aromatique des vins est maintenant reconnu (1). Ces souches se caractérisent par des spécificités métaboliques, notamment au niveau de la formation d'arômes, et par une capacité importante de production d'enzymes hydrolytiques qui sont impliquées dans la révélation d'arômes variétaux. Ainsi, même si elle est limitée au début de la fermentation, leur croissance peut contribuer de façon significative à la complexité et la typicité des vins. Ainsi, le développement de levains mixtes associant souches non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*, doit permettre de répondre aux attentes des producteurs de la filière qui, pour s'imposer dans un marché mondial de plus en plus concurrentiel, cherchent à proposer des vins présentant une complexité organoleptique accrue.

Toutefois, en pratique, l'apport des levures non-*Saccharomyces* à la qualité des vins n'est pas observé de façon systématique et varie notamment en fonction des caractéristiques du moût. D'autre part, le développement de levures non-*Saccharomyces* en début de procédé conduit obligatoirement à une diminution des ressources nutritionnelles. Cela peut par la suite être préjudiciable à la croissance des souches de *S. cerevisiae* (2), dont l'implantation est requise pour assurer l'achèvement de la fermentation alcoolique. Il apparaît donc qu'une meilleure connaissance de la physiologie de ces espèces (métabolisme, consommation de nutriments,...) est nécessaire pour mieux exploiter leur potentiel en œnologie. Dans ce contexte, les objectifs de ce projet étaient de déterminer les traits phénotypiques d'intérêt technologique d'espèces de levures issues du consortium œnologique et d'étudier leurs besoins nutritifs pour proposer des stratégies de fermentation séquentielle avec *S. cerevisiae*.

Techniques expérimentales et matériels utilisés

Ce travail a été focalisé sur trois espèces de levures fréquemment rencontrées dans la flore indigène des moûts de raisin : *Metschnikowia pulcherrima*, *Kluyveromyces marxianus* et *Starmerella bacillaris*.

Des fermentations en souche pure ou en inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae* (ajoutée après 48 h) sont réalisées à l'échelle laboratoire (250 mL ou 1L) sur un milieu synthétique mimant la composition d'un moût de raisin. Ce milieu contient notamment de fortes concentrations en sucres et de faibles teneurs en azote (200 mg N/L sous forme d'un mélange d'ammonium et d'acides aminés) et en lipides (5 mg/L de phytostérols représentatifs des bourbes œnologiques : β -sitostérol majoritairement, campestérol et stigmastérol).

Le dégagement de CO₂ (correspondant à la cinétique fermentaire) est mesuré par suivi de la perte de poids. Les teneurs en sucres résiduels et en composés issus du métabolisme carboné central (glycérol, éthanol, acides organiques) sont dosées par HPLC et les concentrations en acides aminés sont mesurées par chromatographie liquide ionique couplée à une détection colorimétrique après dérivatisation post-colonne à la ninhydrine. Les profils aromatiques ont été déterminés par analyse GC-MS (chromatographie en phase gazeuse-détection par spectrophotométrie de masse). Les activités enzymatiques hydrolytiques sont mesurées par dosages colorimétriques, en utilisant des substrats synthétiques dont l'hydrolyse libère un groupement chromophore.

Résultats

Par rapport aux conditions de référence en culture pure de *S. cerevisiae*, des modifications importantes du profil de formation d'arômes sont observées lors de fermentations menées en inoculation séquentielle *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*, ajoutée après 48 h de fermentation (**Figure 1A**). En particulier, la croissance des levures *M. pulcherrima* en début de procédé conduit à une augmentation significative de la formation d'isobutanol et d'isoamyl alcool et de l'ensemble des esters d'acétate (amyl acétate, isoamyl acétate, isobutyl acétate et phényléthanol). A l'inverse, la production d'acides gras à moyenne chaîne est diminuée.

De plus, l'espèce *M. pulcherrima* se caractérise par une capacité élevée de production d'enzymes hydrolytiques, qui sont impliquées dans la libération d'arômes variétaux à partir de leurs précurseurs apportés dans les moûts de raisin (**Figure 1B**). Ainsi, un niveau substantiel d'activité β -lyase, enzyme impliquée dans la libération de thiols, est mesuré tout le long de fermentations en présence de *M. pulcherrima*, alors qu'aucune activité n'est détectée au cours de fermentation de *S. cerevisiae*. L'ensemble de ces données souligne le potentiel de souches de *M. pulcherrima*, de par leurs caractéristiques enzymatiques et de production d'arômes fermentaires, pour améliorer la qualité organoleptique des vins lorsqu'elles sont utilisées en inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae*.

Toutefois, la comparaison des populations cellulaires et des profils de production de CO₂ entre cultures de *S. cerevisiae* en souche pure et en inoculation séquentielle avec *M. pulcherrima* (**Figure 1C**, encart) montre une mauvaise implantation des levures *S. cerevisiae* au cours de la modalité inoculation séquentielle. Cela se traduit par un ralentissement marqué de la cinétique fermentaire. L'analyse du niveau de consommation des sources d'azote après 48 h de fermentation, qui correspond au moment de l'ajout de la souche de *S. cerevisiae* dans le mode d'inoculation séquentielle, montre une consommation partielle de la ressource azotée disponible (49 %). Toutefois, certains acides aminés, comme le glutamate et la glutamine, et les acides aminés branchés (leucine, isoleucine, valine), sont totalement consommés par *M. pulcherrima*. L'épuisement de ces sources d'azote pourrait être à l'origine de la limitation de croissance de *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle avec *M. pulcherrima*. Ce phénomène peut aussi être expliqué par une limitation en un autre nutriment ou la production par l'espèce non-*Saccharomyces* d'un métabolite inhibiteur pour *S. cerevisiae*.

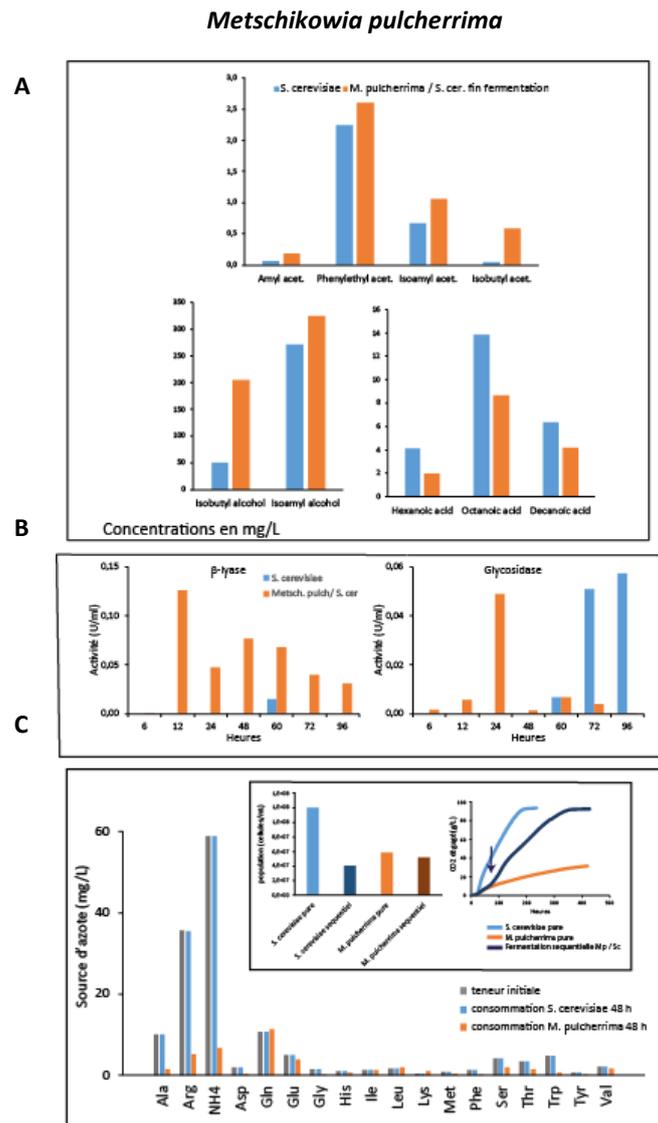


Figure 1. Fermentation séquentielle *Metschnikowia pulcherrima* / *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Production d'arômes fermentaires (concentrations mesurées en fin de fermentation) et (B) activités hydrolytiques au cours de fermentation de *S. cerevisiae* et de fermentation séquentielle *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae*. (C) Population cellulaire, production de CO₂ (encart ; la flèche indique le moment d'inoculation par *S. cerevisiae*) et consommation des sources d'azote au cours de cultures en souche pure et de fermentation séquentielle *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*.

Au cours de fermentations séquentielles *S. bacillaris* / *S. cerevisiae*, l'espèce *S. bacillaris* présente des particularités phénotypiques liées à l'activité du métabolisme carboné central qui peuvent présenter un intérêt technologique pour l'œnologie (3). Tout d'abord, cette espèce se caractérise par son caractère fructophile, qui se traduit par une consommation exclusive de fructose en début de fermentation séquentielle, avant l'ajout de *S. cerevisiae* (Figure 2A). Cette consommation précoce de fructose peut être avantageuse dans le cas de fermentations difficiles, pour lesquelles une partie des sucres, essentiellement du fructose, n'est pas consommé par *S. cerevisiae*. Cette espèce se différencie également de *S. cerevisiae* par sa forte capacité de production de glycérol, et à l'inverse son faible niveau de formation d'acétate (Figure 2B). Cela conduit à une augmentation de la teneur en glycérol et une diminution de celle en acétate, ces deux propriétés métaboliques étant recherchées au cours de l'élaboration des vins, pour l'obtention de produits moins acides et avec de la rondeur.

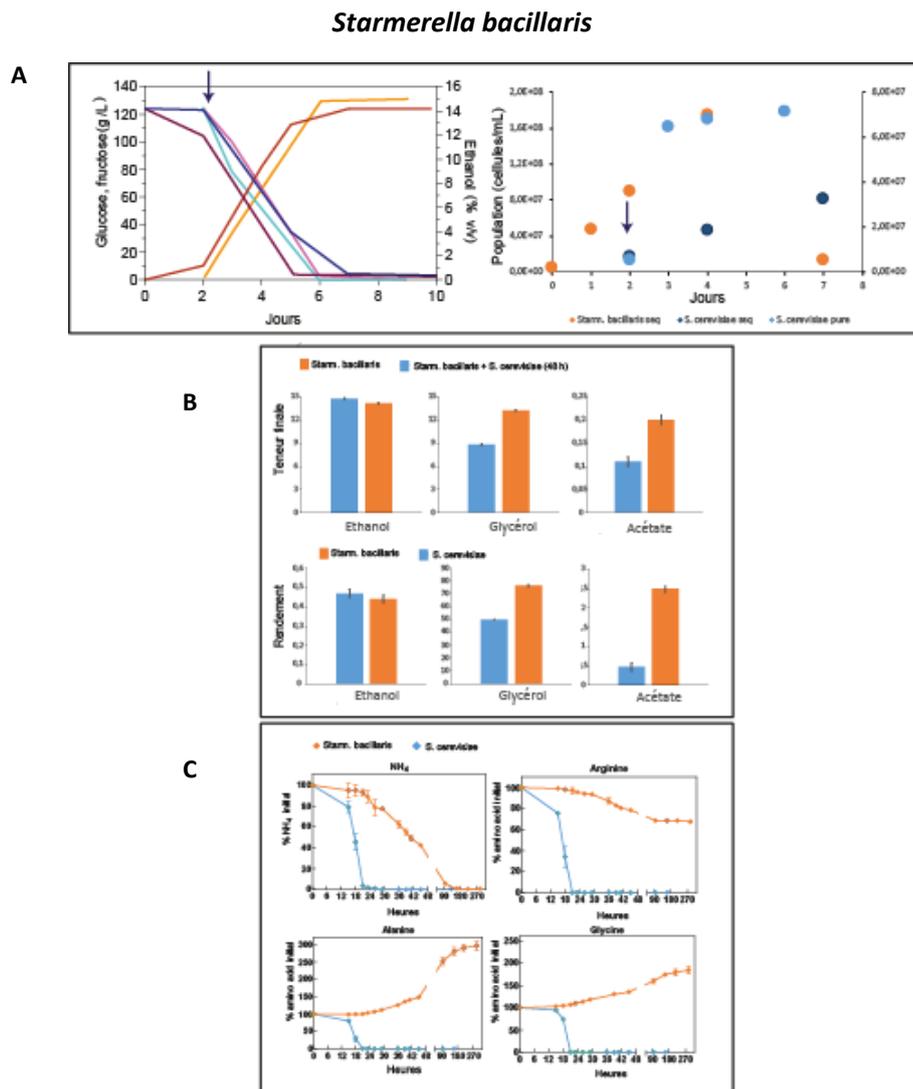


Figure 2. Fermentation séquentielle *Starmerella bacillaris* / *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Production d'éthanol (orange), consommation de glucose (bleu) et de fructose (rouge) au cours de fermentation de *S. cerevisiae* (en clair) et de fermentation séquentielle *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* (en foncé). Croissance de *S. cerevisiae* en culture pure (bleu clair) et en culture séquentielle (bleu foncé) avec *S. bacillaris* (orange). La flèche indique le moment d'inoculation par *S. cerevisiae*. (B) Production de métabolites en fin de culture pure de *S. cerevisiae* et de culture séquentielle *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* et rendements de production des métabolites de *S. cerevisiae* et *S. bacillaris*. (C) Consommation/production de sources d'azote au cours de cultures en souche pure de *S. cerevisiae* et de fermentation séquentielle *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*.

Enfin, nous avons observé des différences majeures dans le profil d'assimilation des sources d'azote entre *S. cerevisiae*, qui mobilise en 48 h l'ensemble de la ressource azotée du milieu pour sa croissance et *S. bacillaris* (Figure 2C). Cette espèce n'utilise que partiellement la ressource azotée (30 %) en consommant préférentiellement certaines sources d'azote comme l'ammonium et l'arginine. D'autres composés ne sont pas assimilés ou sont même produits (alanine, glycine, leucine), ce qui peut être avantageux en fermentation séquentielle pour moduler la formation de composés volatils par *S. cerevisiae*. Par contre, le fort niveau de consommation de certaines sources d'azote par *S. bacillaris* peut être une des causes de l'implantation limitée de *S. cerevisiae* (Figure 2A) et doit être pris en compte pour le développement de fermentations séquentielles.

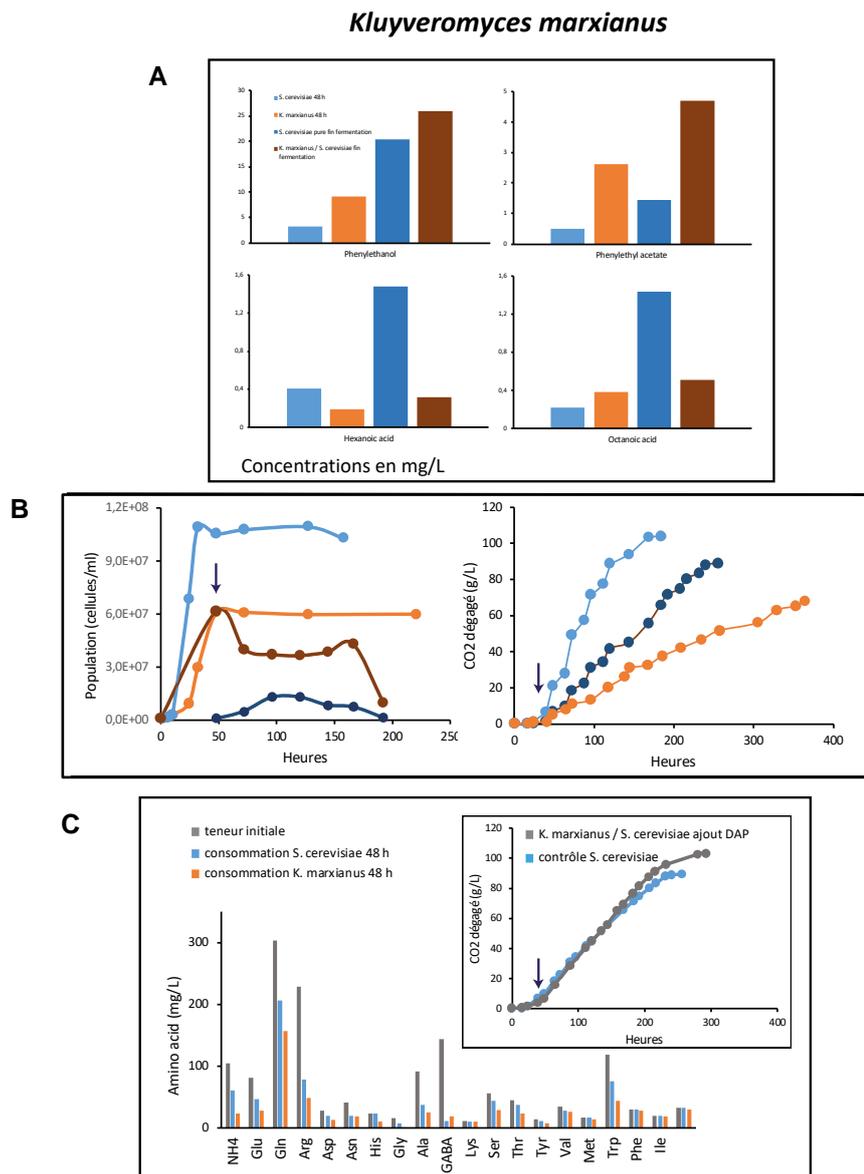


Figure 3. Fermentation séquentielle *Kluyveromyces marxianus* / *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Production d'arômes fermentaires au cours de fermentation de *S. cerevisiae* et de fermentation séquentielle *K. marxianus* / *S. cerevisiae*. (B) Population cellulaire, production de CO₂ (la flèche indique le moment d'inoculation par *S. cerevisiae*). (C) Consommation de sources d'azote par *S. cerevisiae* et *K. marxianus*. Encart : Restauration de la cinétique de *S. cerevisiae* (bleu) par addition d'azote au cours de fermentation séquentielle *K. marxianus* / *S. cerevisiae* (gris) ; la flèche indique le moment d'ajout de *S. cerevisiae* et d'azote.

La réalisation de fermentations séquentielles *K. marxianus* / *S. cerevisiae* conduit à des modifications des profils de formation d'arômes particulièrement intéressantes dans un contexte œnologique (4). En effet, on observe, dès le début de la fermentation, une forte augmentation de la teneur en phényléthyl acétate, et plus généralement en esters d'acétate, composés volatils impliqués dans le caractère fruité des vins (Figure 3A). Cette modification s'accompagne d'une augmentation de la formation de certains alcools supérieurs et d'une diminution de la formation d'acides gras à moyenne chaîne, dont la formation n'est pas souhaitable lors de l'élaboration des vins (odeur de rance et de chèvre).

La croissance de *K. marxianus* en début de fermentation conduit à un ralentissement de la cinétique fermentaire tout le long du procédé, qui s'explique par une implantation très réduite de *S. cerevisiae* (**Figure 3B**). La comparaison des profils d'assimilation des sources d'azote entre les deux espèces montre des niveaux de consommations similaires après 48 h de culture, et un épuisement de la ressource azotée au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* est probablement à l'origine de sa mauvaise implantation. Pour valider cette hypothèse, des ajouts d'azote (sous forme organique ou minérale) ont été effectués au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae*, et ont permis de restaurer la cinétique fermentaire de référence (**Figure 3C**, encart).

Conclusion

L'ensemble de ces données montrent la grande diversité phénotypique des levures non-*Saccharomyces* du consortium œnologique, qui, par des traits d'intérêt technologique absents chez *S. cerevisiae*, peuvent contribuer de façon positive au procédé de vinification. Ces caractéristiques sont spécifiques d'une espèce ou d'un petit groupe d'espèces. Ainsi, l'apport de levures *K. marxianus*, et dans une moindre mesure de *M. pulcherrima*, module la teneur finale en arômes fermentaires des vins, notamment en esters d'acétate : ces deux espèces pourront être utilisées pour apporter des notes fruitées au produit fini. L'espèce *M. pulcherrima* présente également une forte capacité de production d'enzymes hydrolytiques, en particulier de β -lyases, et son utilisation est adaptée pour faciliter la libération de thiols variétaux (cépage Colombar, Sauvignon blanc). A l'inverse, *S. bacillaris* ne permet pas de moduler la formation d'arômes fermentaires, mais montre une forte capacité d'utilisation du fructose, et son utilisation en fermentation séquentielle peut permettre de limiter les problèmes d'achèvement de la fermentation par *S. cerevisiae*. Cette espèce se caractérise également par une réorientation métabolique vers la production de glycérol au détriment de l'éthanol, et peut donc être utilisée lorsqu'on recherche à abaisser légèrement le degré alcoolique des vins (de l'ordre de 0,5°C).

Il apparaît également que les trois espèces étudiées présentent des besoins nutritifs différents (en ce qui concerne la nutrition azotée), et que leur développement en début du procédé de fermentation peut entraîner des difficultés d'implantation de *S. cerevisiae*.

Ainsi, la mise en œuvre de fermentations séquentielles non-*Saccharomyces* / *S. cerevisiae* pour améliorer la qualité des vins nécessite :

- d'une part d'adapter le choix de l'espèce à l'objectif visé (formation d'arômes fermentaires, libération d'arômes variétaux, gestion de la fin de fermentation...)
- d'autre part de mettre en place, en prenant en compte les besoins nutritionnels de l'espèce non-*Saccharomyces* utilisée en début de procédé, des stratégies de nutrition de *S. cerevisiae* pour permettre sa bonne implantation.

Références

- (1) Padilla B., Gil J.V., Manzanares P. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*. 2016. 7:411. doi:10.3389/fmicb.2016.00411.
- (2) Blateyron L., Sablayrolles J.M. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *J. Biosci. Bioeng.* 2001. 91:184. doi:10.1016/S1389-1723(01)80063-3.
- (3) Englezos V., Giacosa S., Rantsiou K., Rolle L., Cocolin L. *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. *Current Opinion in Food Science*. 2017. 17:30-35. doi.org/10.1016/j.cofs.2017.08.007.
- (4) Rollero S., Bloem A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Divol B. Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Frontiers in Microbiology*. 2018. 9:196. doi: 10.3389/fmicb.2018.00196

Que savons-nous de plus aujourd'hui sur la diversité des levures *Saccharomyces cerevisiae* en œnologie ?

Jean-Luc Legras

UMR SPO, INRA Montpellier

Introduction

La fermentation alcoolique est une étape décisive de la transformation du moût de raisin en vin. Depuis la découverte du rôle des levures par Pasteur à la fin du 19^{ème} siècle, la nature de ce microorganisme, sa spécificité en fonction des régions, des crus et des vins, l'ampleur de sa contribution à l'arôme des vins ont été le sujet de débats récurrents pour les viticulteurs. Chaque vigneron pense souvent posséder une flore unique dans ses parcelles, adaptée au terroir local et à la transformation du raisin. De plus, l'image d'une flore régionale de levure est de plus en plus véhiculée par les médias, avec une connotation de respect de la nature. En parallèle, la technique du levurage qui s'est largement développée dans les années 1980-90 pour remédier en premier lieu aux problèmes d'arrêts des fermentations puis pour l'amélioration de la qualité organoleptique, est aussi critiquée par certains vinificateurs au nom de la perte d'authenticité.

De 1990 à aujourd'hui, grâce au développement de différentes générations d'outils moléculaires, la connaissance de l'écologie et de la diversité des levures *S. cerevisiae* présentes dans les vignobles a considérablement évolué, puisqu'on est passé de l'idée de levures quasi exclusivement présentes dans les chais à une vision plus globale de l'écosystème vigne-vin.

1- Evolution des techniques moléculaires de caractérisation de *S. cerevisiae*

Les années 1990 ont été marquées par la mise au point de l'électrophorèse en champ pulsé (ECP) permettant la séparation des chromosomes et par le développement du profil de restriction de l'ADN mitochondrial (mDNA-RFLP) pour différencier les levures *S. cerevisiae* œnologiques (Vezinhet *et al.*, 1990) (**Figure1**). Ces deux techniques et leurs variantes ont permis de suivre l'implantation de levures sélectionnées dans un chai (Frezier and Dubourdieu, 1992), d'évaluer la diversité régionale des levures (Versavaud *et al.*, 1995), ou enfin d'estimer la dissémination des levures commerciales au vignoble (Valero *et al.*, 2005). La découverte de l'amplification d'ADN par PCR a permis ensuite le développement d'une seconde génération de méthodes de typage des levures. La méthode la plus populaire aujourd'hui inventée en 1993, est basée sur l'amplification de régions situées entre des éléments répétés (delta) répartis aléatoirement dans le génome (Ness *et al.*, 1993; Legras and Karst, 2003). Cette «PCR interdelta» permet d'atteindre le même niveau de différenciation que les méthodes précédentes (Schuller *et al.*, 2004). Ces trois méthodes présentaient cependant des faiblesses: l'impossibilité de détecter de petites variations (ECP), la focalisation sur l'ADN mitochondrial seulement (mDNA-RFLP), l'origine multiple de bandes de même taille (PCR interdelta), et enfin l'impossibilité d'augmenter l'information disponible pour accroître la résolution. Les dernières méthodes développées ont cherché à corriger ces défauts et à offrir une meilleure résolution.

L'analyse de régions contenant des motifs microsatellites, motifs simples de deux ou trois bases nucléiques répétées en nombre variable d'une souche à l'autre, a permis à la fois d'améliorer la spécificité des allèles et d'augmenter la puissance d'analyse en combinant une dizaine de marqueurs. La comparaison de séquences est apparue en 2005-06 (Fay and Benavides, 2005a; Ayoub *et al.*, 2006) mais les performances atteintes avec quelques gènes étaient moins bonnes que celles obtenues avec des marqueurs microsatellites. Enfin, l'évolution du coût de séquençage permet aujourd'hui de réaliser le séquençage direct d'un génome.

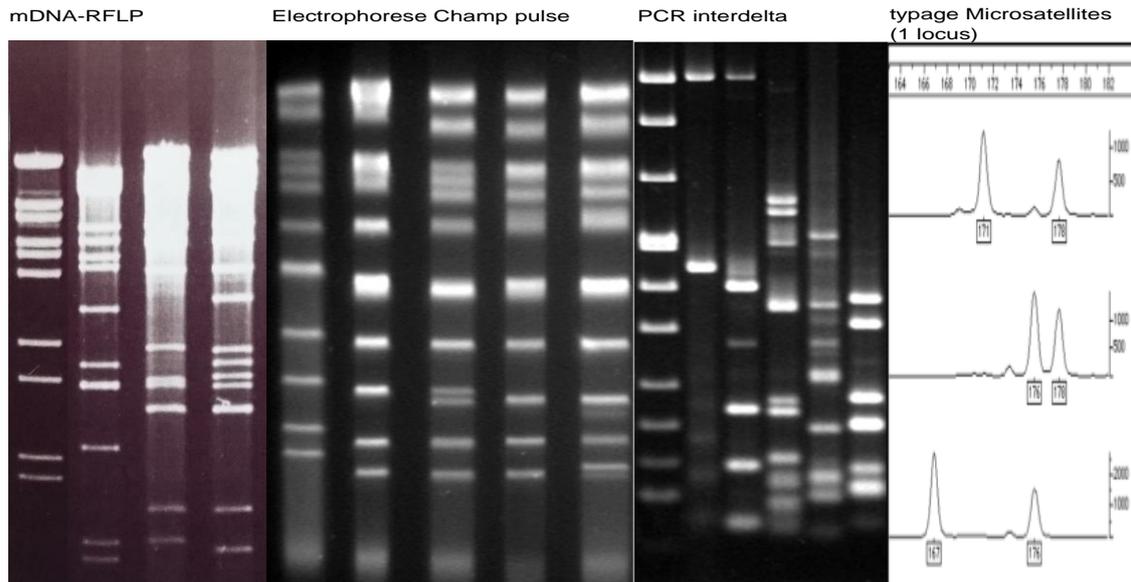


Figure 1. Profils obtenus avec les différentes méthodes de caractérisation moléculaire. De gauche à droite: gels d'électrophorèse des trois premières méthodes mDNA-RFLP, ECP, PCR interdelta, et signal de fluorescence mesuré lors d'une électrophorèse de typage d'un locus microsatellite (à droite). Un pic est équivalent à une bande sur un des gels présentés à gauche.

2- Les levures de vin et histoire de la vinification

Bien que la séquence du génome de la levure *S. cerevisiae* ait été la première à être déchiffrée chez un organisme eucaryote, il existait peu d'information sur la diversité de cette espèce de champignon. Ce n'est qu'en 2005 et en 2007 qu'ont été publiées les premières études dévoilant sa diversité (Fay and Benavides, 2005b; Legras *et al.*, 2007). On peut aujourd'hui distinguer les levures de vin, de pain, de bière, de fromage, de rhum, de vin de palme, de saké ou même de chêne sur la base des différences de leur ADN (**Figure 2**).

Parmi les différents groupes de levures, une famille est tout à fait remarquable par son extension géographique, celle des levures de vin. Les souches de vin se retrouvent dans tous les vignobles du monde: Europe, Amérique, Afrique du Sud, Japon et Australie. A l'exception de plusieurs souches sélectionnées (EC1118, 522Davis), multipliées industriellement et distribuées dans le monde entier, on trouve un très grand nombre de souches différentes qui semblent uniques à leur vignoble d'isolement. Une famille de levures isolées à partir de voiles (Vin jaune, Sherry, Vernaccia di Oristano...) est proche des levures de vin classiques, et ce groupe contient le groupe des levures isolées en Champagne (EC1118, DV10, CHP...) qui sont issues d'un croisement entre les levures de vin et de voile.

Les levures isolées dans la nature (écorce de chêne, litière au pied des arbres) en Europe, se trouvent dans un autre groupe dans l'arbre phylogénétique (**Figure 1**). Les levures de chêne ne sont d'ailleurs pas capables d'achever la fermentation d'un moût de raisin d'une teneur en sucre moyenne (Camarasa *et al.*, 2011). En revanche, les levures de vin sont issues d'une population de levures de chêne trouvées autour de la Méditerranée (Almeida *et al.*, 2015).

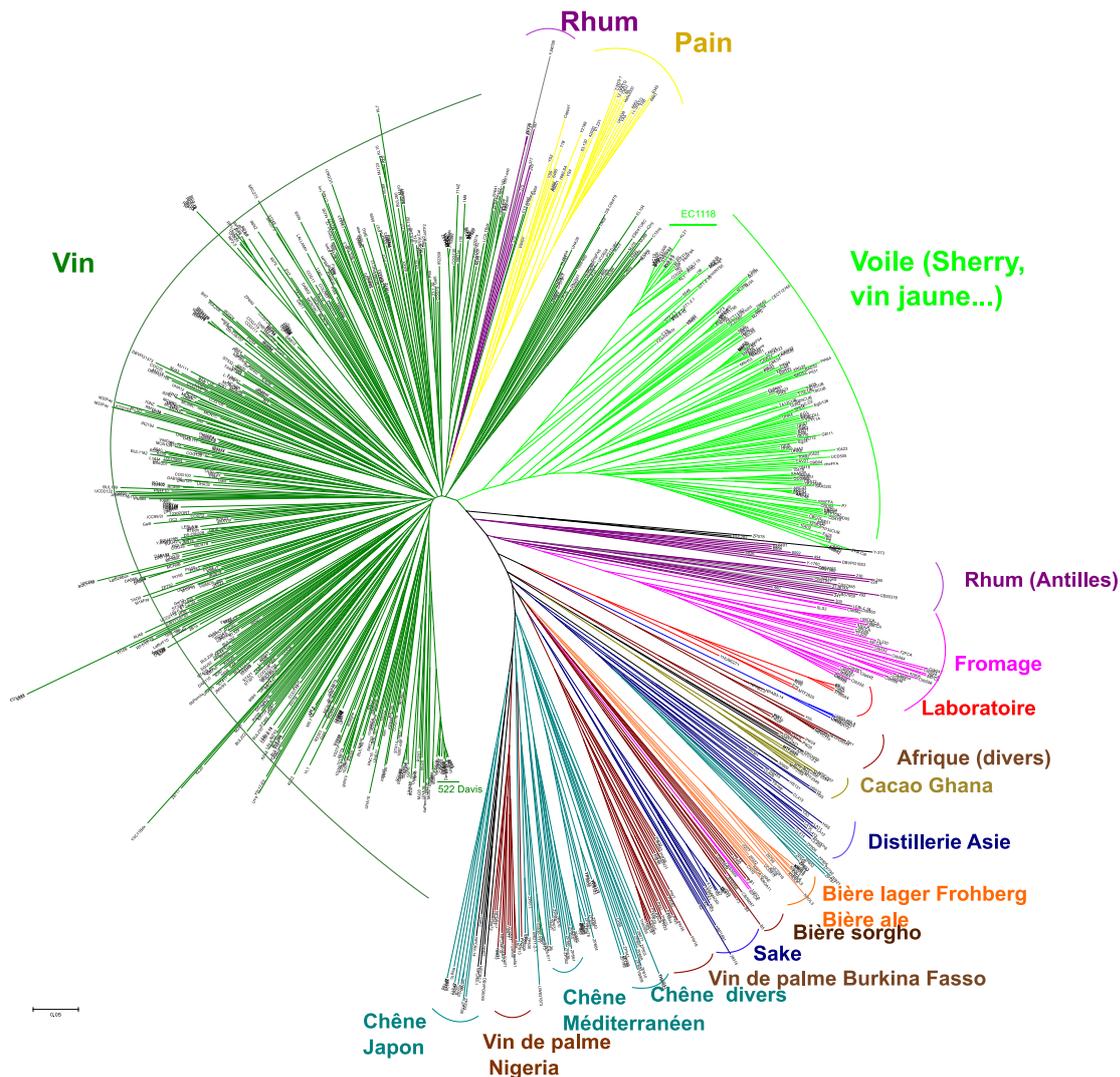


Figure 2. Arbre phylogénétique présentant la diversité de 1000 souches de levures *S. cerevisiae* isolées de différentes origines (d'après Legras *et al.*, 2007). Le niveau de parenté entre les souches est indiqué par la longueur des branches qui relient un individu à un autre. L'arbre a été obtenu à partir de la caractérisation de 12 loci microsatellites et construit à partir de la distance de Bruvo.

3- Diversité régionale de *S. cerevisiae*

L'utilisation de marqueurs microsatellites a permis également de mener des analyses par population (**Figure 3**). La première analyse de cet arbre indique une origine unique des levures de vin de vignobles du monde entier. La position particulière de la population de souches du Liban est en accord avec la possibilité d'une origine située en Mésopotamie d'où ces levures ont pu se répandre avec l'essor de la viticulture (Fay and Benavides, 2005; Legras *et al.*, 2007).

La comparaison de groupes de levures de vignobles proches laisse aussi envisager une migration associée aux voies de communication fluviale (vallée du Rhône/Saône, Danube, Méditerranée) et aux cépages (échange du cépage Melon entre la Bourgogne et la Vallée de la Loire, ou de l'Ugni blanc entre l'Italie et la région de Cognac). Les différentes branches de cet arbre suggèrent enfin une spécificité géographique des populations de levures. Aussi plusieurs auteurs ont recherché les facteurs qui expliquent les différences entre les populations de levure *S. cerevisiae* de vignobles au Portugal, en

Nouvelle Zélande, en Italie et en France. Ces travaux, montrent la présence de structure de population, et globalement des différenciations régionales plus ou moins marquées, avec de fortes variations entre sites (Gayevskiy and Goddard, 2012; Schuller *et al.*, 2012; Viel *et al.*, 2017). Les différences liées au cépages semblent également faibles (Schuller *et al.*, 2012) mais d'une manière générale les facteurs expliquant ces structures de population semblent complexes.

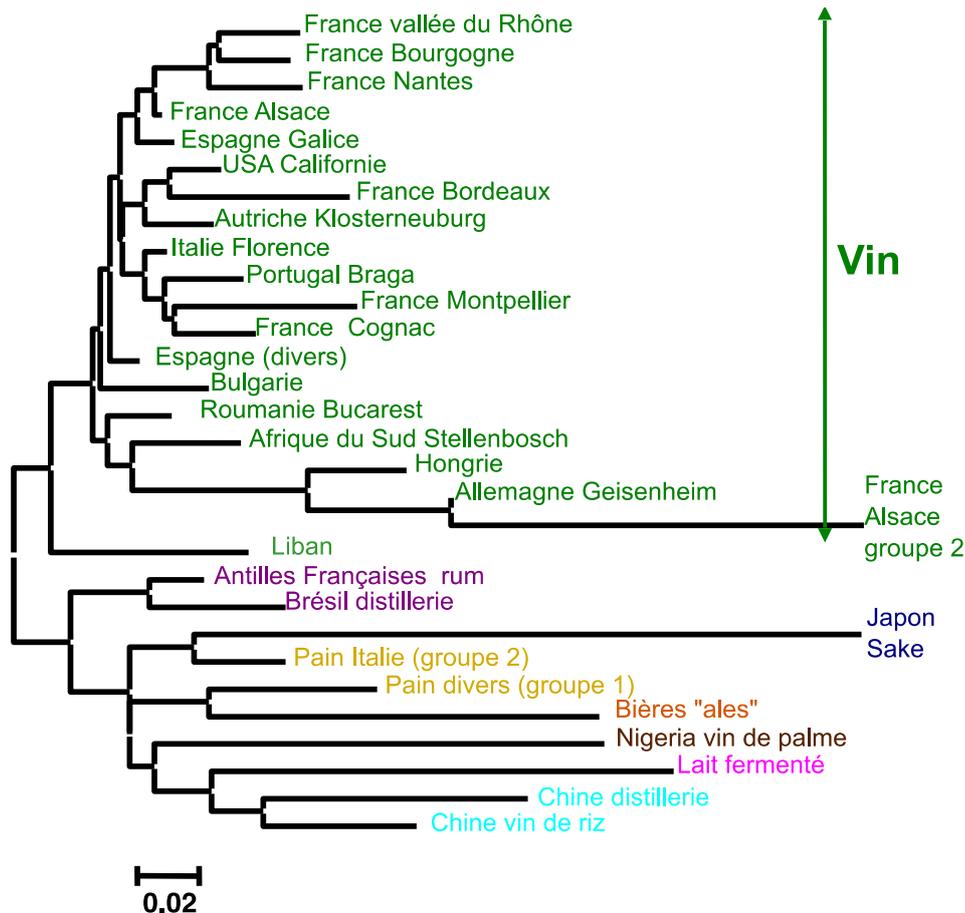


Figure 3. Arbre présentant les liens entre les populations de levures *S. cerevisiae* isolées de différents vignobles, ou d'autres origines (Modifié d'après Legras *et al.*, 2007). Etabli à partir de la matrice de distance Fst entre populations.

4- Caves, starters et levures de raisin

L'origine des levures présentes dans les fermentations des cuves nonensemencées est toujours un sujet de débat. Les différents travaux publiés semblent indiquer un lien entre les flores retrouvées dans les chais et les flores des parcelles sans qu'on puisse conclure à une identité de ces 2 flores (Goddard *et al.*, 2010; Börlin *et al.*, 2016).

En ce qui concerne les flux de levures du chai à la parcelle, les premières analyses réalisées en 2005 indiquaient qu'ils étaient très faibles (Valero *et al.*, 2005). Récemment, l'analyse des populations de levures isolées à partir de raisin, dans plusieurs régions viticoles (Italie, Canada, Bordeaux) a laissé

apparaître la présence de 10 à 25% de souches apparentées à des starters (Martiniuk *et al.*, 2016; Viel *et al.*, 2017). Cependant, les résultats de ces études doivent être nuancés: dans le cas de l'étude canadienne, les prélèvements ont été faits à moins d'un km du chai, et dans celui de l'étude italienne, nous n'avons pas ce type de données. De tels résultats n'étaient pas attendus car le maintien des levures au vignoble d'une année sur l'autre n'avait pas été observé dans des essais de pulvérisations de LSA sur les pieds de vigne (Cordero-Bueso *et al.*, 2011). En conclusion, il semble logique de considérer que les flores de vigne et de chai sont en équilibre.

5- Cryophilie et levures hybrides

S. cerevisiae n'est pas capable de mener des fermentations à basse température. L'analyse de populations de levures de moûts fermentant à basse température a permis d'isoler des levures appartenant à l'espèce voisine *Saccharomyces uvarum* qui est cryophile (Demuyter *et al.*, 2004). Mais certaines levures cryophiles, dont plusieurs levures commerciales, sont en fait des hybrides interspécifiques entre *S. cerevisiae*, et *S. uvarum* (S6U) ou encore entre *S. cerevisiae*, et *Saccharomyces kudriazevii*, une autre levure cryophile, (ALS, Vin7, UvafermCS2, Lalvin W27, Uvaferm CEG). Ces levures hybrides présentent en général les aptitudes des deux espèces. Cette situation est similaire à celle connue pour les levures de bière dites « lager » issues également d'un croisement entre une espèce cryophile (*Saccharomyces eubayanus*) et *S. cerevisiae*.

6- Levures *S. cerevisiae* et leurs vecteurs

En 1878, Pasteur a été le premier à montrer, qu'une fois protégée, les baies de raisin restaient stériles jusqu'à la récolte. La population de levures *S. cerevisiae* sur raisins sains est extrêmement faible. En revanche, une baie altérée peut contenir facilement 10⁶ cellules. Par quels mécanismes les baies sont-elles inoculées par les levures ? Le lien avec l'altération des baies suggère l'intervention des insectes. Les guêpes peuvent blesser les baies avec leurs pièces buccales et sont de bonnes candidates capables de fournir un premier foyer de développement aux levures. Alors que la composition de la microflore levurienne de ces insectes varie, *S. cerevisiae* est présent étonnamment tout au long de l'année (Stefanini *et al.*, 2012). De plus, leurs larves conservent les cellules de *S. cerevisiae* dans leur tube digestif durant l'hivernage. L'année suivante, ces guêpes adultes peuvent ainsi « inoculer » leurs levures aux nouveaux fruits. Les mouches de vinaigre *Drosophila melanogaster* sont quant à elles, fortement attirées par les jus en fermentation dont elles s'alimentent, et emmènent ainsi sur elles des cellules de levure (Les esters ou acétates semblent être les molécules impliquées dans l'attraction des drosophiles). Les abeilles, contiennent également des levures *S. cerevisiae* dans leur microflore.

Les oiseaux semblent également aussi pouvoir véhiculer des levures, en particulier sur de grandes distances, cependant le maintien des cellules de levure dans le tube digestif est court (Francesca *et al.*, 2012).

A coté de la vection due à la faune, une équipe italienne a mis en évidence la présence de *S. cerevisiae* dans l'air à une fréquence de 0,1 cellule par m³, mais seulement dans une région viticole sur trois. Il est donc probable que les courants d'air puissent participer à la vection des levures, mais sans doute de manière plus limitée (Vigentini *et al.*, 2014).

Conclusion

Les levures *S. cerevisiae* de vin ont été dispersées de part le monde au fil de l'extension de la viticulture. Il est nécessaire d'abandonner le concept de « levure de terroir » au profit de « population de levures régionale ». La flore levurienne des raisins est en équilibre avec les populations d'insectes présentes dans la parcelle, et est liée à la population de levure retrouvée dans le chai. Toutefois, la spécificité régionale des populations de levures ne veut pas dire nécessairement que ces populations présentent une meilleure aptitude technologique à valoriser les cépages régionaux.

Références

- Almeida P, Barbosa R, Zalar P, Imanishi Y, Shimizu K, Turchetti B, Legras J-L, Serra M, Dequin S, Couloux A, et al. 2015. A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Mol. Ecol.* 24:5412–5427.
- Ayoub M-J, Legras J-L, Saliba R, Gaillardin C. 2006. Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J. Appl. Microbiol.* 100:699–711.
- Börlin M, Venet P, Claisse O, Salin F, Legras J-L, Masneuf-Pomarède I. 2016. Cellar-associated *Saccharomyces cerevisiae* population structure revealed high diversity and perennial persistence in Sauternes wine estates. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.03627-15.
- Camarasa C, Sanchez I, Brial P, Bigey F, Dequin S. 2011. Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. Harris S, editor. *PLoS One* 6:e25147.
- Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A, Valero E. 2011. Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Demuyter C, Lollier M, Legras J-L, Le Jeune C, LeJeune C. 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97:1140–1148.
- Fay JC, Benavides JA. 2005a. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1:66.
- Fay JC, Benavides JA. 2005b. Hypervariable noncoding sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 170:1575–1587.
- Francesca N, Canale DE, Settanni L, Moschetti G. 2012. Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environ. Microbiol. Rep.* 4:105–112.
- Frezier V, Dubourdieu D. 1992. Ecology of Yeast Strain *Saccharomyces cerevisiae* During Spontaneous Fermentation in a Bordeaux Winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43:375–380.
- Gayevskiy V, Goddard MR. 2012. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *ISME J.* 6:1281–1290.
- Goddard MR, Anfang N, Tang R, Gardner RC, Jun C. 2010. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environ. Microbiol.* 12:63–73.
- Legras J-L, Karst F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:249–255.
- Legras J-L, Merdinoglu D, Cornuet J-M, Karst F. 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16:2091–2102.
- Martiniuk JT, Pacheco B, Russell G, Tong S, Backstrom I, Measday V. 2016. Impact of Commercial Strain Use on *Saccharomyces cerevisiae* Population Structure and Dynamics in Pinot Noir Vineyards and Spontaneous Fermentations of a Canadian Winery. Schacherer J, editor. *PLoS One* 11:e0160259.
- Ness F, Lavallée F, Dubourdieu D, Aigle M, Dulau L. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62:89–94.
- Schuller D, Cardoso F, Sousa S, Gomes P, Gomes AC, Santos M a S, Casal M. 2012. Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions. *PLoS One* 7:e32507.
- Iero E, Dequin S, Casal M. 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231:19–26.
- Stefanini I, Dapporto L, Legras J-L, Calabretta A, Di Paola M, De Filippo C, Viola R, Capretti P, Polsinelli M, Turillazzi S, et al. 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:13398–13403.
- Valero E, Schuller D, Cambon B, Casal M, Dequin S. 2005. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5:959–969.
- Versavaud A, Courcoux P, Roulland C, Dulau L, Hallet JN. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3521–3529.
- Viel A, Legras J-L, Nadai C, Carlot M, Lombardi A, Crespan M, Migliaro D, Giacomini A, Corich V. 2017. The Geographic Distribution of *Saccharomyces cerevisiae* Isolates within three Italian Neighboring Winemaking Regions Reveals Strong Differences in Yeast Abundance, Genetic Diversity and Industrial Strain Dissemination. *Front. Microbiol.* 8:1595.
- Vigentini I, De Lorenzis G, Fabrizio V, Valdetara F, Faccincani M, Panont C a., Picozzi C, Imazio S, Failla O, Foschino R. 2014. The vintage effect overcomes the terroir effect: a three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepo Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiology* 161:362–373.

La mortalité des levures en fermentation alcoolique : le rôle clé des limitations en micronutriments et de l'azote

Bruno Blondin¹, Camille Duc^{1,2}, Martine Pradal¹, Jessica Noble², Catherine Tesnière¹

¹ UMR SPO, INRA, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, 34060, Montpellier, France

² Lallemand SAS, 31702, Blagnac, France

Introduction

Les fermentations languissantes ainsi que les arrêts de fermentations restent un souci d'actualité en vinification. La mortalité des levures est un phénomène souvent associé aux arrêts de fermentations mais les mécanismes responsables ne sont que partiellement connus. La perte de viabilité des levures au cours des fermentations œnologiques a jusqu'ici été surtout expliquée par des quantités insuffisantes de lipides des moûts et leurs conséquences en terme de composition des membranes des levures. L'impact de la composition en lipides a été également largement abordé en lien avec les effets de l'éthanol qui est le premier facteur de stress rencontré par la levure en fermentation alcoolique. Toutefois ces approches ne rendent pas compte de manière satisfaisante de l'apparition de la mortalité des levures et des arrêts dans de nombreuses situations œnologiques.

Dans ce travail, nous avons abordé la question de la mortalité en fermentation en nous appuyant sur les données récentes qui ont mis en évidence l'importance du premier nutriment limitant provoquant l'arrêt de la croissance sur la survie des levures au cours de la phase stationnaire (Boer *et al.*, 2008). Ces travaux ont, de plus, souligné la différence de réponse des levures selon la nature du premier nutriment limitant et ils ont apporté un nouveau cadre conceptuel pour appréhender la question de la mortalité des levures en relation avec les limitations en nutriments. C'est sur la base de ces connaissances que l'impact d'une limitation en lipides en fermentation alcoolique a été abordé dans un premier temps puis étendue à d'autres micronutriments (Tesnière *et al.*, 2013 ; Duc *et al.*, 2017). Pour cela, nous avons évalué puis analysé plus en détail, certaines conditions nutritionnelles entraînant une perte de viabilité des levures de façon dépendante de l'azote, et nous avons cherché à apporter des informations nécessaires à la compréhension des mécanismes régulant cette viabilité, par des approches physiologiques et génétiques.

Résultats

L'impact de la nature du nutriment limitant la croissance a été étudié en mettant en œuvre la souche EC1118 dans un moût synthétique MS contenant des niveaux de micronutriments et d'azote variables. L'effet d'une limitation en ergostérol a été évalué de sorte à considérer deux situations : - une où l'arrêt de croissance de la levure est provoqué par un faible niveau d'ergostérol alors qu'il reste de l'azote dans le milieu, - l'autre où l'arrêt a lieu par une limitation simultanée en ergostérol et en azote. Les niveaux de nutriments milieux ont été fixés de sorte à ce que la population soit équivalente dans chaque situation et afin que la quantité d'ergostérol disponible pour les levures soit similaire (**Figure 1**). On observe que quand l'ergostérol limite seul la croissance (niveau d'azote élevé), la perte de viabilité en phase stationnaire est importante. Elle augmente au cours du temps mais aussi en fonction de la teneur en alcool du milieu ce qui nous conduit à représenter la mortalité en fonction du niveau de CO₂ dégagé (directement lié au niveau d'alcool du milieu). Par contre quand la croissance de la levure est limitée à la fois par l'ergostérol et l'azote la viabilité est préservée à un niveau élevé. La présence d'un niveau élevé d'azote est donc impliquée dans la mortalité associée au faible niveau d'ergostérol. Cette mortalité a

des conséquences du point de vue de la consommation des sucres par la levure et on constate que le niveau élevé d'azote conduit à un arrêt de fermentation avec des sucres résiduels élevés alors que le faible niveau d'azote permet une consommation totale des sucres.

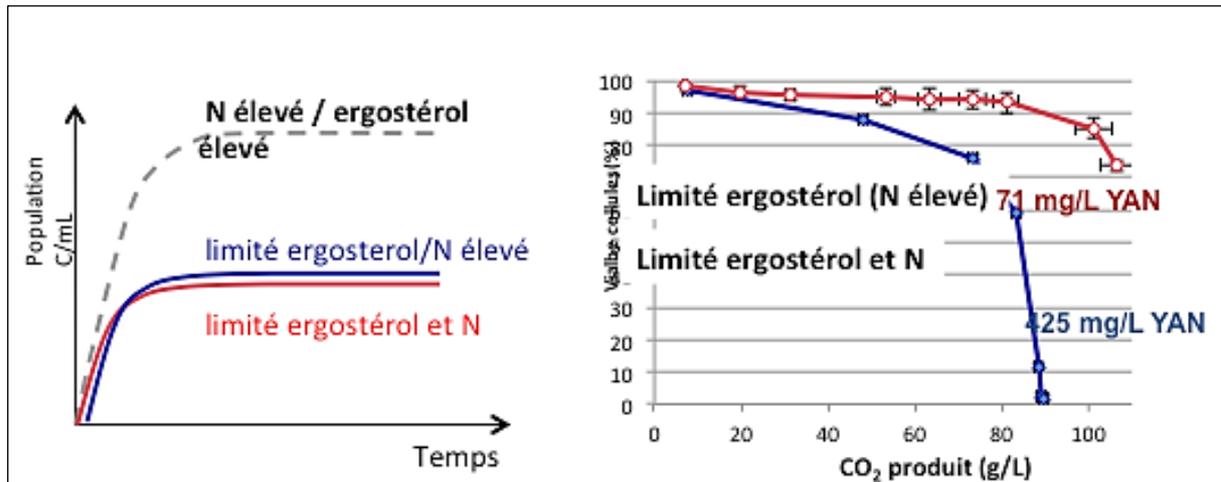


Figure 1. Impact du niveau d'azote sur la mortalité lors de limitations en ergostérol.

Une même démarche a été conduite pour d'autres micronutriments et une même réponse à leur limitation et à l'azote a été observée pour l'acide oléique, l'acide pantothénique et l'acide nicotinique. Dans les trois cas une mortalité dépendante de l'azote a été mise en évidence (Figure 2). Il y a donc un mécanisme général qui entraîne la mortalité liée à la limitation de la croissance par certains micronutriments. Par contre nous avons observé que certains micronutriments n'entraînent pas de mortalité des levures dans les mêmes conditions. C'est le cas de la thiamine, de la biotine et de l'inositol dont les faibles niveaux perturbent le déroulement des fermentations sans entraîner de mortalité des levures. La levure a donc développé une capacité à s'adapter à la limitation en certains nutriments mais pas à d'autres.

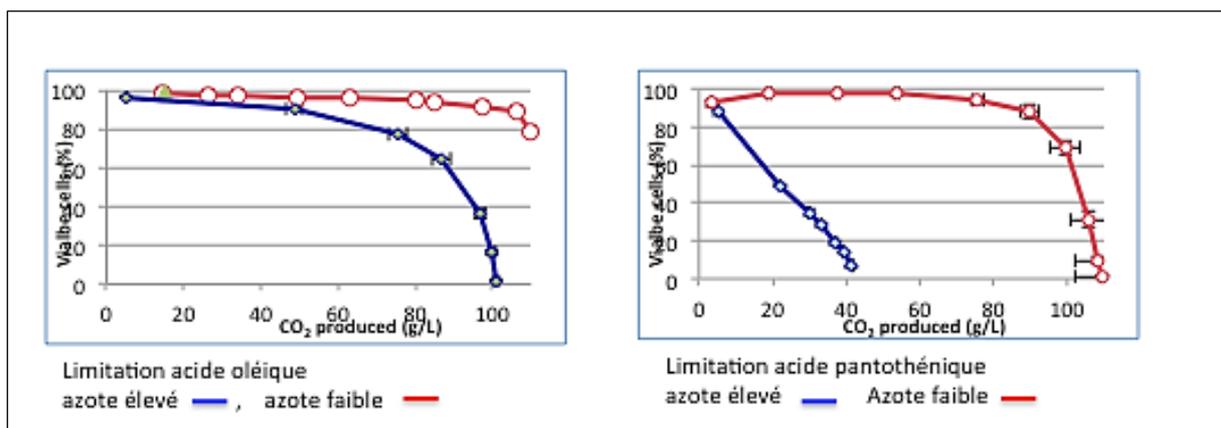


Figure 2. Impact du niveau d'azote sur la mortalité lors de limitations en acide oléique et en acide pantothénique.

La mortalité des levures provoquée par les limitations en micronutriments est liée au statut azoté du milieu. Divers travaux ont montré que l'azote pouvait moduler la réponse des levures à des stress environnementaux. En particulier, il a été montré que la perception de l'azote par la levure, en particulier par la voie TOR (Target Of Rapamycin) pouvait induire un signal qui contrôle la réponse au stress. Nous avons pu confirmer que cette voie de signalisation était bien impliquée dans la mortalité par l'étude de la réponse de mutants de cette voie. Ces mutants ne sont pas sensibles aux limitations en micronutriments en fermentation.

Nous avons par ailleurs évalué la capacité des levures à acquérir une résistance aux stress lors de fermentations correspondant à différentes limitations nutritionnelles. En accord avec les schémas connus de contrôle de la réponse au stress, nous avons observé que lors de fermentations limitées par l'azote, les levures développaient une résistance au stress lors de l'arrêt de la croissance. Cette réponse leur permet de résister à des stress tels qu'un traitement à la chaleur mais aussi à l'éthanol. Par contre, les limitations en micronutriments donnant lieu à de la mortalité (ergostérol, oléate, acide pantothénique, acide nicotinique) ne conduisent pas à la mise en place d'une réponse stress lors de l'arrêt de croissance. Ce défaut de réponse stress est bien sûr un élément clé qui explique l'apparition de la mortalité dans ces situations nutritionnelles.

Nous avons enfin évalué la capacité de différentes sources d'azote à entraîner une mortalité lors de fermentations carencées en micronutriments. Ces informations peuvent être utiles car la nature des sources d'azote résiduelles lors de carences en micronutriments peut varier suivant les situations œnologiques. Par ailleurs, ces informations peuvent être utiles pour gérer la complémentation des moûts carencés en azote. Nous avons observé que la plupart des acides aminés n'ont qu'une faible capacité à entraîner la mortalité quand ils sont apportés seuls. Néanmoins certains d'entre eux, en particulier les acides aminés aromatiques et la lysine ont une forte capacité à induire la mortalité. Plus curieusement, nous avons observé que la proline peut entraîner une forte mortalité quand elle est présente à des niveaux élevés (354 mg N/L). Cet effet de la proline est inattendu vu que la proline est souvent présente à des niveaux élevés dans les moûts et n'est pas une source d'azote assimilable. Ces données amènent à reconsidérer les effets du niveau de proline dans les moûts dans ces situations de carence. On s'est par ailleurs attaché à évaluer l'impact de l'ammonium vu son intérêt dans la supplémentation des moûts carencés en azote. Nous avons examiné l'effet de l'apport de l'ammonium suivant deux modalités, dans le moût avant fermentation et au cours de la fermentation à 1/3 de la consommation des sucres. L'apport d'ammonium (354 mg N /L) à un moût carencé en ergostérol avant fermentation induit une forte mortalité des levures et entraîne un arrêt de fermentation avec un niveau élevé de sucres résiduels (**Figure 3**).

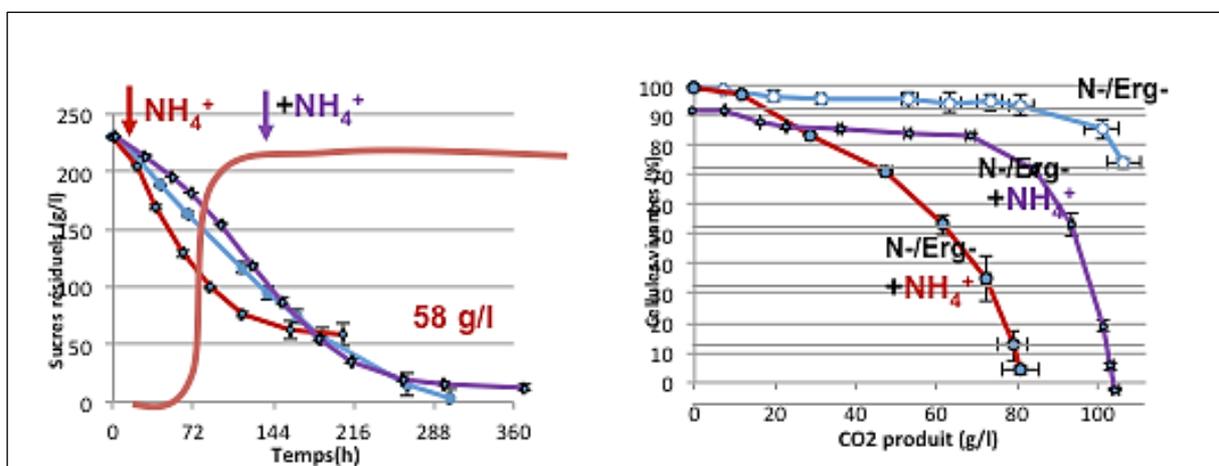


Figure3. Impact de l'addition de NH₄⁺ sur la mortalité.

Dans le cas d'une addition de l'ammonium au 1/3 de la fermentation, le niveau de viabilité des levures n'est que peu affecté et la consommation des sucres est accélérée et complète. Les différences de réponse entre les deux stades d'apport de l'ammonium peuvent s'expliquer par leur impact sur les conditions d'entrée en phase stationnaire. Quand l'ammonium est ajouté dans le moût, c'est l'ergostérol qui limite la croissance et ne permet pas un développement de réponse stress provoquant la mortalité des levures. Par contre, quand l'addition est réalisée en phase stationnaire, le faible niveau d'azote est responsable de l'arrêt de croissance qui induit une réponse stress protégeant la levure et que l'addition tardive d'azote n'affecte pas. Les mécanismes identifiés ici donnent une explication à l'efficacité constatée des ajouts tardifs d'ammonium comparés à leur apport dans les moûts.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons abordé la question de la mortalité en fermentation en nous appuyant sur les données récentes qui ont mis en évidence l'importance du premier nutriment limitant provoquant l'arrêt de la croissance sur la survie des levures. Nous montrons que la mortalité en fermentation entraînée par les limitations en micronutriments est liée à leur incapacité à mettre en place des mécanismes de survie lors de l'arrêt de croissance. Nous avons observé ce phénomène avec des micronutriments qui peuvent correspondre à des carences dans les milieux œnologiques, en particulier pour l'ergostérol et l'acide oléique mais éventuellement aussi pour les acides pantothéniques et nicotiniques. Les situations de forte clarification des moûts sont vraisemblablement celles qui par l'épuisement en lipides se rapprochent des situations examinées ici et où les mécanismes décrits sont opérants. Dans ces cas là nous montrons que la mortalité est étroitement contrôlée par le niveau d'azote des moûts via une modulation de la réponse stress des levures. La prise en compte de l'azote dans la mortalité des levures est une donnée majeure de ce travail pour la gestion des situations carencées en micronutriments. Ces résultats permettent de mieux cerner les mécanismes impliqués dans l'apparition de la mortalité des levures en fermentation. Ils doivent aussi permettre de mieux raisonner les apports d'azote, en particulier d'ammonium, dans ces situations de carences.

Références

- Boer V.M., Amini S., Botstein D. (2008). Influence of genotype and nutrition on survival and metabolism of starving yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 6930-6935.
- Duc C., Pradal M., Sanchez I., Noble J., Tesnière C., Blondin B. (2017) A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLoS ONE* 12(9): e0184838
- Tesnière C., Delobel P., Pradal M. & Blondin B. (2013). Impact of nutrient imbalance on wine alcoholic fermentations: nitrogen excess enhances yeast cell death in lipid-limited must. *Plos One*, 8. e61645

Effet des lipides des bourbes sur la conduite des fermentations et la viabilité des levures

Catherine Tesnière¹, Erick Casalta¹, Giovana Girardi-Piva¹, Martine Pradal¹, Aude Vernhet¹, Jean-Marie Sablayrolles¹, Jean-Michel Salmon²

¹INRA-UMR Sciences pour l'œnologie-Montpellier-France

²INRA Unité expérimentale de Pech Rouge-Gruissan- France

Introduction

Le taux de particules solides présentes après clarification des moûts a un impact sur le déroulement de la fermentation et sur la qualité finale du vin. Cet impact sur la fermentation est lié à leur teneur en lipides, en particulier les stérols. Ces derniers permettent aux levures de résister aux stress de l'éthanol et de la température. Les levures ne pouvant synthétiser leurs propres stérols en absence d'oxygène, les lipides apportés par les bourbes compensent au moins partiellement les déficiences en oxygène. Une clarification excessive des moûts peut donc aboutir à des effets négatifs, comme par exemple des arrêts de fermentation ou des fermentations languissantes. D'un autre côté, un taux de particules solides résiduelles trop élevé peut conduire à la formation d'arômes négatifs (odeurs de réduit) et de saveurs herbacées.

Ces phénomènes et mécanismes sont, pour la plupart, identifiés depuis de nombreuses années mais ils demeurent imparfaitement décrits et maîtrisés. Cet exposé vise précisément à faire un point de nos connaissances actuelles sur ces lipides des bourbes : caractérisation, assimilation, conséquences sur la viabilité des levures et le déroulement des fermentations.

Origine et caractérisation des bourbes

Les bourbes proviennent de fragments de cellules végétales déstructurées au cours des opérations d'extraction, et de l'agrégation de composés insolubles du moût. Leur nature et quantité varient de manière importante selon la matière première et le processus d'extraction. On observe en effet une différence de composition des bourbes selon l'itinéraire technologique choisi.

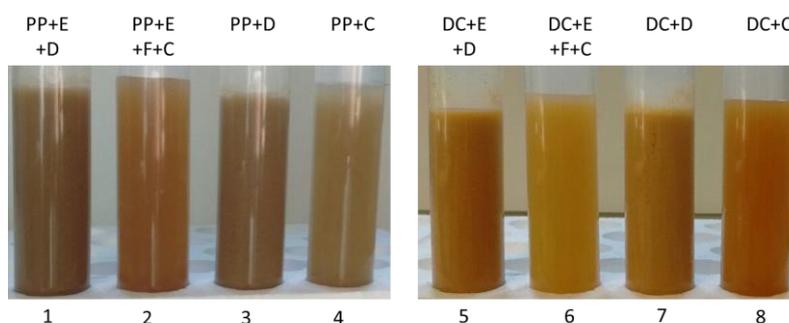


Figure 1. Bourbes obtenues par différents itinéraires technologiques.

PP: presseur pneumatique, DC: décanteur centrifuge, E: enzymage, F: traitement 2h au froid, D: décantation 14h au froid

Par exemple à partir d'un cépage blanc des phénomènes d'oxydation beaucoup plus importants sont observés sur les bourbes issues de pressurage pneumatique que sur celles issues du décanteur centrifuge (**Figure 1**). En effet, les activités polyphénol oxydase et estérase du raisin, qui contribuent à la consommation de l'oxygène dissous, au brunissement des moûts et à la réduction des teneurs en esters, sont associées aux particules solides.

La taille des particules est généralement d'un diamètre inférieur à 2 µm comme le montrent les images ci-dessous prises au microscope électronique (**Figure 2**).

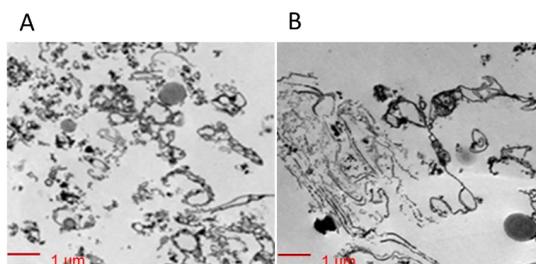


Figure 2. Observation au microscope électronique de bourbes (A) et d'une fraction de bourbes enrichie en lipides (B).

Ces particules s'agrègent dans les moûts. Des marquages spécifiques des différentes familles de lipides ont été réalisés avec des sondes fluorescentes (**Figures 3 et 4**). On observe au microscope à épifluorescence que les lipides (sous forme de phytostérols, phospholipides et triglycérides) sont associés aux particules solides par adsorption ou co-précipitation. Ils représentent environ 10 % de la matière sèche totale des bourbes. Si dans les baies de raisin à maturité les acides gras insaturés sont majoritaires, leur proportion varie dans les particules solides. Ainsi des moûts blancs peuvent contenir jusqu'à 53 % d'acides gras saturés et 47 % d'acides gras insaturés. La teneur en phytostérols des particules solides varie de 3 à 10 mg d'équivalents cholestérol/g de matière sèche. La composition en phytostérols est très proche de celle de la pulpe et de la pellicule de raisin. Le β -sitostérol en est le composé majoritaire.

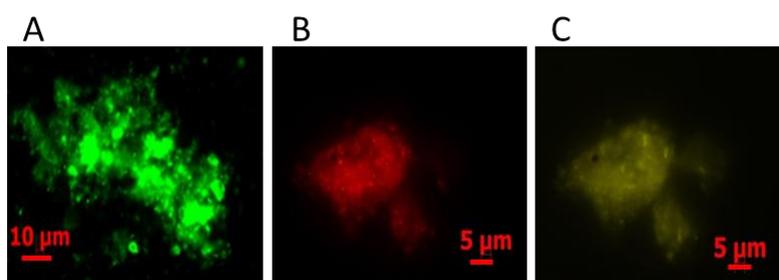


Figure 3. Coloration de bourbes observées au microscope à épifluorescence. (A) stérols, (B) phospholipides, (C) triglycérides.

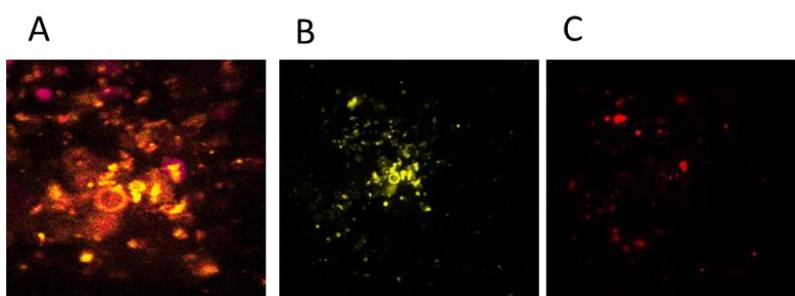


Figure 4. Coloration de bourbes observées au microscope confocal. (A) phospholipides + chlorophylle, (B) phospholipides, (C) chlorophylle.

Assimilation des lipides des bourbes

En absence d'oxygène, les levures puisent les phytostérols dans le milieu et les intègrent dans leurs membranes (**Figure 5A, 5D**). Ceci est possible grâce à deux transporteurs de stérols (AUS1 et PDR11) dont l'activité d'importation augmente au cours de la fermentation (**Figure 5B**). En leur absence (délétion des gènes AUS1 et PDR11, noté Δ AUS1 Δ PDR11), les levures *Saccharomyces cerevisiae* ne peuvent se multiplier comme le montre le test de croissance sur milieu solide (test en goutte, **Figure 5C**) où l'on observe une absence de croissance de la levure sans transporteurs de stérols (Δ AUS1 Δ PDR11).

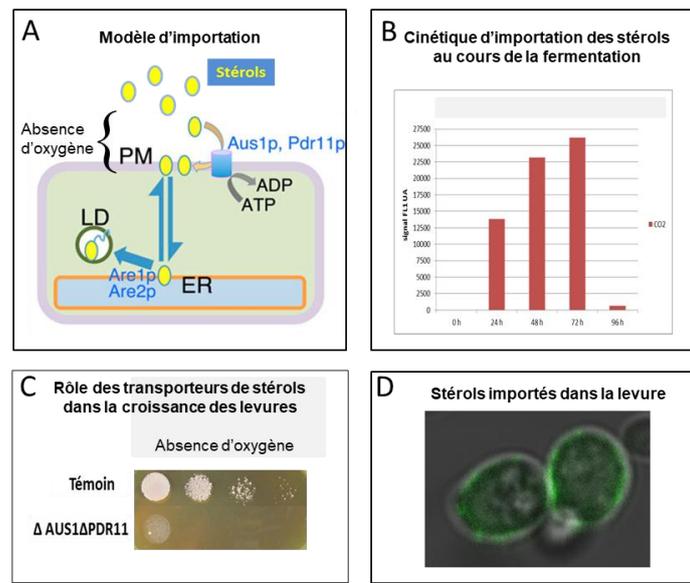


Figure 5. Modèle d'importation des stérols (A), cinétique d'importation des stérols par les levures au cours de la fermentation (B), effet de la délétion des transporteurs de stérols sur la croissance des levures (C) et localisation des stérols dans la levure par marquage au 25-NDB cholestérol (D).

Impact des lipides des bourbes sur le déroulement des fermentations et la viabilité des levures

Les bourbes ont un effet important sur les cinétiques fermentaires (**Figure 6**). En augmentant leur teneur, on augmente les vitesses maximales de fermentations et les cinétiques sont globalement plus rapides. Ceci est lié à une meilleure assimilation de l'azote entraînant une augmentation de la population de levures et une stimulation de leur métabolisme (Casalta *et al.*, 2013). Le facteur

nutritionnel clé des bourbes est leur contenu en phytostérols (**Figure 6B**) et des cinétiques de fermentations identiques sont observées avec des phytostérols d'origines différentes mais en même quantité (1 mg/L, **Figure 6C**). On peut considérer que 2 à 4 mg de phytostérols/L sont généralement nécessaires pour que la levure atteigne sa biomasse maximale, mais ces besoins varient selon la souche de levure utilisée (jusqu'à 8 mg/L). D'autre part, plus le moût est riche en azote, plus la levure a besoin de phytostérols pour assimiler la totalité de l'azote (Casalta *et al.*, 2013).

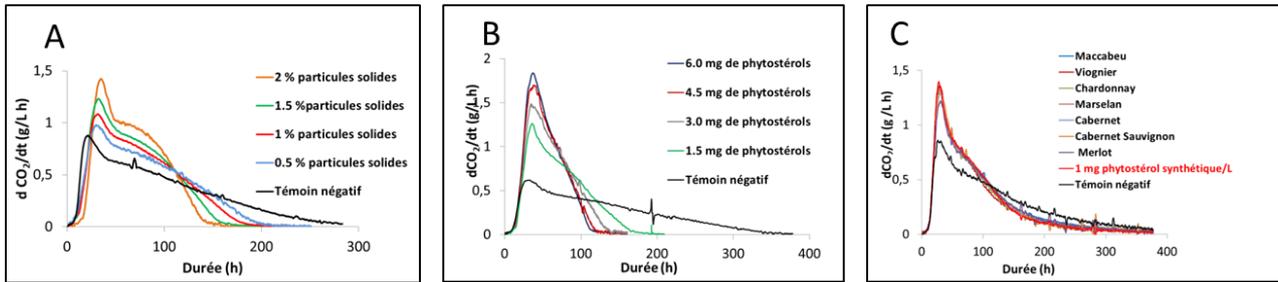


Figure 6: Effet de l'addition de bourbes ou de phytostérol synthétique sur la cinétique de fermentation d'un moût synthétique. La vitesse de fermentation est suivie par la vitesse de dégagement de CO₂. **(A)** particules solides de Sauvignon, **(B)** addition de phytostérol synthétique, **(C)** particules solides de différentes variétés (quantités ajustées pour obtenir 1 mg/L de phytostérols).

Ces lipides permettent, par ailleurs, de conserver une bonne viabilité en fin de fermentation (**Tableau 1**).

Tableau 1. Effet des particules solides sur la viabilité des levures

% particules solides	0	0,5	1,5
Viabilité à 40% de fermentation	69%	91%	96%
Viabilité à 80% de fermentation	45%	65%	85%

Conclusion

Nous avons progressé dans nos connaissances sur le contenu en lipides des bourbes, leur impact sur la fermentation alcoolique, et les principaux mécanismes mis en jeu, en particulier le rôle clé des phytostérols. Cela permet de mieux raisonner la gestion des particules solides dans les mouts mais pas encore de parfaitement l'optimiser. En effet, il s'agit de trouver le meilleur compromis en termes de niveau de clarification des mouts pour adapter la teneur en phytostérols aux conditions de fermentation. Or, la richesse en azote des mouts, les teneurs des bourbes en phytostérols et les besoins des levures en ces nutriments sont variables, ce qui rend la construction d'« abaques » particulièrement complexe. Par ailleurs, la mesure de la turbidité des mouts ne constitue pas un indicateur précis de leur teneur en stérols et il y a un réel enjeu à rechercher un paramètre plus pertinent mais suffisamment facile à mettre en œuvre.

Références

- Casalta E., Cervi M.-F., Salmon J.-M., Sablayrolles J.M., 2013. White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids on alcoholic fermentation under oenological conditions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 47 - 52.
- Casalta E., Coloignier M., Salmon J.M., Sablayrolles J.M., 2017. Grape solids: composition and impact on alcoholic fermentation. *Enoforum*, May 2017, Vicence, Italy.
- Casalta E., Vernhet A., Sablayrolles J.M., Tesnière C., Salmon J.M., 2016. Review: Characterization and role of grape solids during alcoholic fermentation under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67, 133-138.
- Luparia V., Soubeyrand V., Berges T., Julien A., Salmon J.M., 2004. Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 25-32.
- Salmon J.M., 2011. Particules solides : impact sur le déroulement de la fermentation. *Revue Française d'Enologie*, 247,12.
- Salmon J.M., Ortiz-Julien A., 2009. Améliorer la fermentation alcoolique en conditions extrêmes. *www.infowine.com*, 17, p. 7.
- Vernhet A., Bes M., Bouissou D., Carrillo S., Brillouet J.M., 2016. Characterization of suspended solids in thermo-treated red musts. *Journal International de la Vigne et du Vin*, 50, 9.

De la perception de l'amertume à l'amertume des vins

Alain Samson¹, Coline Leriche¹, Constant Bégué¹, Charlène Fabre¹, Soline Caillé²

¹INRA, UE 999 Domaine de Pech Rouge, F-11430 Gruissan, France

²INRA, UMR1083, 2 Place Pierre Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France

Introduction

Pour s'adapter à son environnement, l'homme possède 5 sens : la vue, le toucher, l'ouïe, l'odorat et le goût. Ces sens sont souvent utilisés ensemble et en interaction bien que certains prédominent tels que la vue et le toucher. Le sens du goût est quant à lui déterminant dans le choix de la nourriture (Scott, 2005). L'amertume est l'une des cinq composantes qui participe à la saveur des aliments avec l'acidité, le sucré, le salé et l'umami. Chez l'homme et plus généralement chez les mammifères, l'amertume est assimilée à des substances toxiques car effectivement un grand nombre de substances toxiques présentent un goût amer (Glendinning, 1994). C'est pourquoi, c'est une saveur peu appréciée dans l'alimentation que l'on cherche souvent à supprimer ou à atténuer. Identifier les composés qui en sont responsables et comprendre les mécanismes de sa perception sont donc des enjeux de recherche importants.

1. La perception de l'amertume

Aujourd'hui, il est assez réducteur de considérer que les mécanismes neurophysiologiques qui régissent la perception des saveurs par l'humain peuvent se décomposer simplement et ne faire appel qu'à l'aspect gustatif. Les sensations olfactives, et somesthésiques (tactiles, température, douleur...) y contribuent également. Les signaux envoyés par l'ensemble des récepteurs sont transmis au cortex cérébral par 4 nerfs différents : facial, glossopharyngien et vague pour les signaux issues des bourgeons du goût et trijumeau pour les signaux mécaniques, thermiques et chimiques. Les informations traitées dans différentes zones du cortex cérébral et sous-cortical associées aux messages hédoniques ou mémoriels forment une image sensorielle complexe de l'aliment ou de la boisson.

Contrairement aux idées reçues, il n'y a pas de zone de la langue associée spécifiquement à une saveur. En effet, une même cellule gustative, quelle que soit sa localisation, est sensible à plusieurs types de stimulus sapides transmis pas une grande variété de récepteurs gustatifs peu spécifiques. Plus de 8000 bourgeons gustatifs situés essentiellement dans les papilles gustatives de la langue, mais également dans l'épiglotte, le pharynx et le palais, permettent de détecter des molécules sapides (Faurion, 2000).

Ce sont des ions H⁺ et Na⁺ qui par l'intermédiaire de canaux ioniques sont responsables respectivement des saveurs acide et salée. Pour le goût sucré et umami, un nombre assez restreint de récepteurs (T1R1, T1R2, T1R3) sont concernés. Dans le cas de la perception de l'amertume, ce sont des récepteurs de la famille des T2R (Taste 2 Receptor) ou TAS2R qui sont activés (Adler *et al.*, 2000, Lindermann, 2001). C'est une famille d'environ 30 récepteurs TAS2R du goût amer qui a été identifiée chez les mammifères. Ils permettent de reconnaître de nombreux composés amers (Meyerhof, 2005). Cependant, pour la perception de l'amertume, en fonction des composés chimiques ce ne sont pas toujours les mêmes récepteurs qui sont activés. Ainsi, Soares *et al.* (2013) ont montré que pour la famille des polyphénols, un nombre variable de récepteurs TAS2R était activé. Upadhyaya *et al.* (2010) ont montré que c'était 25 récepteurs TAS2R qui étaient activés par des di- et tri- peptides extraits dérivées de protéines de pois et de soja. Les TAS2R sont exprimés dans un sous-ensemble de cellules du récepteur du goût, qui sont distinctes de celles qui répondent aux autres qualités gustatives. Toutefois, les cellules consacrées à la détection des stimuli sucré, umami et amer partagent des composantes de transduction de signal communes (Meyerhof 2005).

L'activation des récepteurs va moduler une cascade de transduction qui sera responsable de la perception finale du goût par le cerveau (Zang *et al.*, 2003 ; Ozeck *et al.*, 2004 ; Chandrashekar *et al.*, 2006):

- Activation d'un récepteur T2R par la liaison d'une molécule amère ;
- Dissociation de la gustducine (α , β et γ) ;
- La sous-unité α de la gustducine active la PLC β 2 qui va cliver PIP2 en DAG et IP3 ;
- IP3 entraîne une libération de Ca²⁺ dans la cellule et donc sa dépolarisation ;
- Ca²⁺ permet l'ouverture du canal TRMP5 et l'entrée de Na⁺ ;
- Libération de neurotransmetteurs et dépolarisation des cellules voisines.

Des variations inter individuelles sur la sensibilité à l'amertume sont observées, elles sont dues à des divergences dans les gènes codants pour les récepteurs du goût (Reed *et al.*, 2006), mais d'autres facteurs tels que des facteurs environnementaux (l'âge, les pathologies, ou encore la prise de médicaments) peuvent également affecter la perception de l'amertume. Toutefois, pour des sujets sains, un facteur intéressant de variations inter individuelles pour la perception du goût amer est le volume de sécrétion de la salive et sa composition protéique (Dsamou, 2012).

2. Composés responsables de l'amertume dans l'alimentation

Il existe un très grand nombre de substances avec des structures chimiques différentes qui ont pu être associées à la perception de l'amertume. Une classification de 93 structures a été établie (Rodgers *et al.*, 2005).

Pour illustrer cette variabilité de composés amers en alimentation, on peut faire référence à quelques aliments ou boissons courantes : l'endive ou chicorée, le pamplemousse, le cacao, la bière, le café ou certains fromages. Pour l'endive, les molécules concernées sont des sesquiterpènes lactones très représentées dans la famille botanique des Astéracées à laquelle appartient l'endive (chicorée) ou le pissenlit. Pour les pamplemoses ou les pamplemousses, ce sont des flavonones comme la naringine ou la neohesperidine combinées à des sucres (flavonosides). Pour le cacao, ce sont des catéchines de la famille des flavanols. Pour la bière, il s'agit principalement de l'isohumulone (acide α) qui provient du houblon. En brasserie, c'est même l'unité de poids en partie par million (ppm) de ce composé qui constitue l'International Bitterness Unit (IBU) pour quantifier l'amertume des bières. Pour le café, c'est un alcaloïde, la caféine, qui est le principal responsable de son amertume. La caféine tout comme un autre alcaloïde la quinine, extraite de l'écorce d'un arbre de la Cordillère des Andes, sont utilisées comme molécules standards en analyse sensorielle pour l'entraînement et la mesure des seuils de perception des juges. Enfin, pour terminer ce panorama, on peut déceler de l'amertume dans certains fromages, notamment à pâte molle, comme par exemple le camembert. Dans ce cas, ce sont des composés azotés qui en sont responsables. En effet, c'est la production de petits peptides par la protéolyse mal contrôlée de micro-organisme tel que *Penicillium caseicolum* qui en est à l'origine (Vassal *et al.*, 1984).

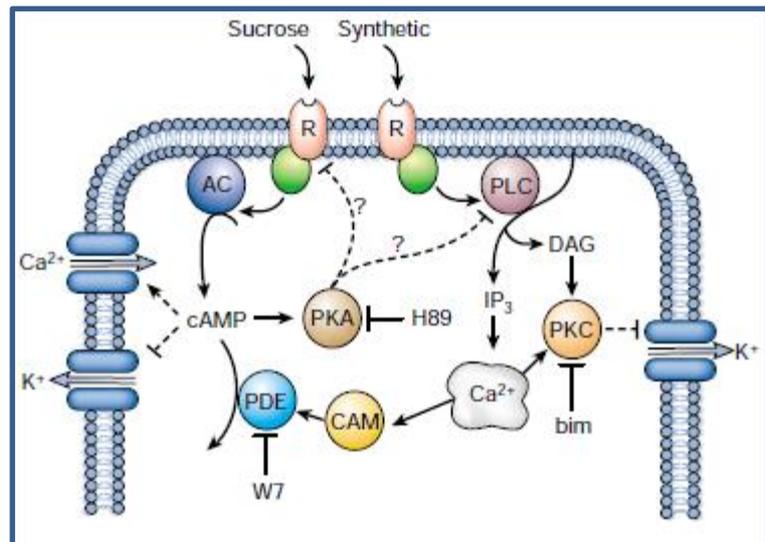


Figure 1. Molécules impliquées dans la transduction du goût sucré. Les récepteurs de deux sucres séparés sont montrés, mais il existe la possibilité qu'un récepteur active les deux (Lindermann 2001). AC, adénylate cyclase, AMPc, adénosine monophosphate cyclique, PDE, phosphodiesterase, CAM, calmoduline, PKA, protéine kinase A, inhibiteur H89, PLC, phospholipase C, DAG, diacylglycérol, IP₃, inositol-1,4,5-trisphosphate, PKC, protéine kinase C, inhibiteur bim (bisindolylmaléimide), inhibiteur W7.

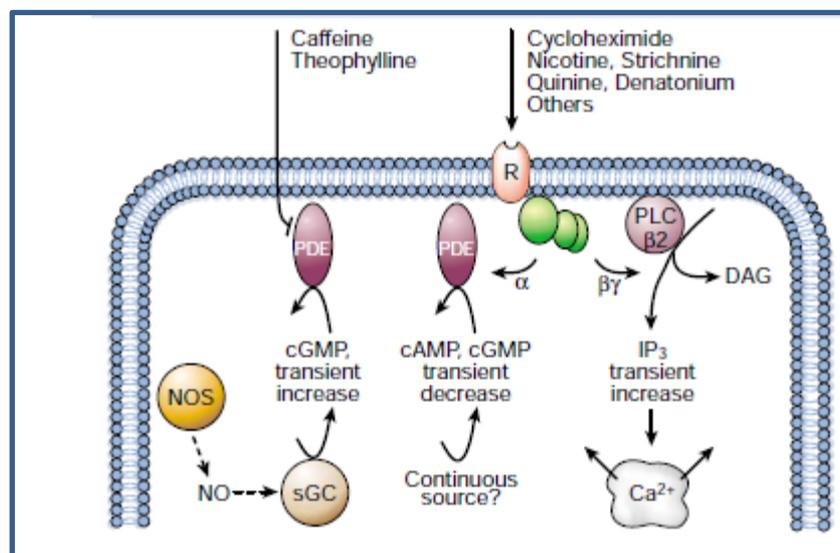


Figure 2. Transduction du goût amer provoquée par une variété de ligands de la famille T2R, couplés à la protéine G gustducine (Lindermann, 2001). PIP₂, Phosphatidylinositol-tri-phosphate; PLCβ₂, phospholipase C β₂; DAG, diacylglycérol; IP₃, inositol-tri-phosphate; TRPM5, canal cationique; αβγ, sous-unités de la gustducine.

3. L'amertume : défaut ou qualité ?

Si l'amertume provoque une réaction de rejet chez l'enfant (Nicklaus *et al.*, 2005), des expériences de consommation et un apprentissage peuvent corriger cette attitude et rendre l'amertume acceptable. Chez l'adulte, l'amertume peut même aller au-delà de l'acceptable et procurer du plaisir. Ainsi, avec

l'évolution de la consommation, l'amertume peut constituer un défaut à corriger. C'est le cas avec la sélection variétale et les techniques de pousses hors sol pour l'endive (Brand *et al.*, 2013). C'est encore le cas avec la sélection variétale pour les pomelos. A titre d'exemple, la variété Star Ruby (rouge) réputée très aromatique mais plus riche en flavonones a une saveur plus amère que la variété Ruby Red (rose) qui est la plus cultivée au monde pour ses qualités gustatives (Mouly *et al.*, 1995). Pour le camembert, c'est le contrôle du développement des micro-organismes dans le processus d'affinage qui va permettre de lutter contre le défaut d'amertume (Vassal *et al.*, 1984).

Cependant, lorsque l'intensité de l'amertume est maîtrisée dans l'itinéraire de production, elle peut constituer un facteur de qualité. C'est typiquement le cas des boissons comme la bière, le café ou le vin.

4. L'amertume dans les vins

Dans le vin, l'amertume fait partie intégrante de l'équilibre gustatif. Dans les vins rouges, avec l'astringence, elle est principalement attribuée aux flavonoïdes et elle participe à leur qualité organoleptique. Il a été montré qu'en fonction du degré de polymérisation, la perception de l'amertume variait. Ainsi, les flavanols monomères sont amers tandis que les oligomères sont essentiellement astringents (Noble, 1994). De même, la différence de chiralité entre 2 flavan-3-ols du vin entraîne une différence significative dans la perception temporelle de l'amertume: l'(-) épicatechine provoque une amertume plus longue en bouche que la (+) catéchine (Noble, 1994). Il a été constaté que dans des vins rouges, les vins au goût amer présentaient des concentrations plus élevées de composés phénoliques (catéchine, épicatechine, acide gallique et caféique et quercétine) que les vins non amers. Ces mesures ont été réalisées avec une langue électronique couplée à un jury expert afin de proposer une méthode rapide d'analyse de l'amertume dans les vins (Rudnitskaya *et al.* 2010). Il existe même une synergie entre les composés polyphénoliques et aromatiques des vins rouges dans la perception de l'amertume (Ferrer-Gallego *et al.*, 2014). Toutefois, Hufnagel *et al.* (2008) suggère que les flavan-3-ols ne seraient pas les composés majeurs pour expliquer l'astringence et le goût amer. Des séries d'esters éthyliques d'acide hydroxybenzoïque et d'acide hydroxycinnamique ont été identifiés comme des composés significativement responsables de l'amertume de vins rouges. Cela pourrait constituer une piste pour expliquer l'amertume des vins blancs peu riches en flavonoïdes.

En effet, pour les vins blancs l'identification des composés responsables de l'amertume est un sujet complexe et largement inconnu, d'autant plus qu'une amertume persistante est perçue négativement par les consommateurs (Sokolowsky *et al.*, 2012). Ces mêmes auteurs préconisent la méthode d'analyse sensorielle du temps-intensité, en se concentrant uniquement sur le descripteur d'amertume, pour décrire les changements gustatifs temporels. D'après de récentes études de l'AWRI (Australian Wine Research Institution), il a été montré que beaucoup de consommateurs sont très sensibles à de faibles niveaux de défauts dans les vins blancs, dont l'amertume (Leigh *et al.*, 2010). Il est bien connu que les vins de muscat sec présentent souvent une saveur amère prononcée. Leur richesse en composés terpéniques qui caractérise leur odeur pourrait en être la cause. Pourtant, Noble *et al.* (1988) ont montré que des glycosides terpéniques isolés à partir d'un vin amer de muscat d'Alexandrie, lorsqu'ils étaient ajoutés à un système modèle ou au vin, à raison d'une et deux fois la concentration du vin d'origine, n'induisaient aucune différence significative au niveau du goût. Par contre, dans l'eau, une différence significative a été produite. Outre la présence ou l'absence de telle ou telle molécule amère, des interactions dans le milieu sont à l'origine d'un renforcement ou d'une atténuation de la perception d'amertume. Ainsi, des teneurs élevées en éthanol renforcent la perception d'amertume (Noble, 1994, Ficher *et al.*, 1994). Pour le glycérol l'effet serait inverse (Jones *et al.*, 2008). Il est bien connu qu'un apport de sucre masque l'amertume du vin ce qui explique qu'à l'état de vins doux, les vins issus des cépages muscat ne présentent plus la même saveur amère qu'ils ont à l'état sec. Des interactions de l'acidité et du pH des vins sur la perception de l'amertume ne sont pas significatives (Noble 1994, Fontoin *et al.*, 2008).

Comme nous l'avons vu précédemment pour d'autres aliments, dans le vin des solutions sont aussi recherchées pour diminuer l'amertume des vins. La pratique du collage des vins qui consiste à ajouter un adjuvant pour éliminer des composés indésirables peut avoir un effet collatéral sur la diminution de l'amertume. C'est un argumentaire qui est fréquemment repris pour de nombreux produits œnologiques actuels.

Conclusion

Par cette courte revue bibliographique nous avons vu que la perception de l'amertume était le résultat d'une chaîne de réactions variées et complexes pour la transmission de l'information au cerveau et que des facteurs génétiques et environnementaux entraînent en jeu pour expliquer une variabilité inter individuelle chez l'être humain. A cela, il faut ajouter la diversité importante des molécules susceptibles de déclencher un stimulus d'amertume. Si les composés responsables de l'amertume sont bien identifiés dans le cas de nombreux aliments, pour le vin le champ d'investigation reste encore très largement ouvert. En effet, pour celui-ci, son origine, la diversité des processus de vinification et sa composition chimique complexe rendent difficile la compréhension de l'amertume de cette boisson.

Références bibliographiques

- Adler E., Hoon M. A., Mueller K. L., Chandrashekar J., Ryba N. J., & Zuker C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 6, 693-702.
- Brand R., Audergon J.M. (2013) La sélection des variétés d'espèces légumières et fruitières en France et en Europe 1960-2012 Innovations variétales et impact sur la production et la mise en marché des produits. *Le sélectionneur français* 64, 71-100.
- Chandrashekar J., Hoon M.A., Ryba N.J.P., Zuker C.S., (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444, 288–294.
- Dsamou M. (2012) Protéome salivaire et sensibilité à l'amertume chez l'Homme. Thèse en Sciences agricoles. Université de Bourgogne, HAL id : tel-00935220.
- Faurion A. (2000) Le goût des sucres : neurophysiologie. *Dossiers scientifiques de l'IFN. Les Glucides Tome 2*, 2-17.
- Ferrer-Gallego R., Hernández-Hierro J.M., Rivas-Gonzalo J.C., Escribano-Bailón M.T. (2014) Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas. *Food Research International* 62 1100–1107
- Fischer, U., Noble A. C. (1994). The effect of ethanol, catechin concentration, and pH on sourness and bitterness of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1, 6-10.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19, 286-291.
- Glendinning J.I., (1994) Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiology & behavior*.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1376 -1386.
- Jones P.R., Gawel R., Francis I.L., Waters E.J. (2008) The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine, *Food Quality and Preference* 19, 596-607.
- Leigh, F. (2010). Linking wine flavour components, sensory properties and consumer quality perceptions. *The Australian and N. Zealand Wine Industry Journal*, 25 (5) 18-23.
- Lindermann B., (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 219–225.
- Meyerhof W., (2005) Elucidation of mammalian bitter taste. *Reviews of Physiol Biochem and Pharmacology*. 154, 37-72.
- Mouly, P., Arzouyan, C. R., Gaydou, E. M., & Estienne, J. M. (1995). Chromatographie des flavanonosides des jus de différentes variétés de pamplemousses. Différenciation par analyses statistiques multidimensionnelles (Differentiation of various grapefruit and pummelo juice varieties using liquid chromatography of flavanone glycosides and pattern recognition techniques). *Analisis*, 23, 336-341.
- Nicklaus S. Boggio V. Issanchou S. (2005) Les perceptions gustatives chez l'enfant. *Archives de Pédiatrie* 12, 5, 579-584.
- Noble A.C. (1994) Bitterness in wine. *Physiology & Behavior*, 56, 1251-1255.
- Noble A.C., Strauss C.R., Williams P.J., Wilson B. (1988) Contribution of terpene glycosides to bitterness in Muscat wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 129-131.
- Ozeck M., Brust P., Xu H., Servant G., (2004) Receptor for bitter, sweet and umami, taste couple to inhibitor, G protein signaling pathways. *European Journal of Pharmacology* 489, 139-149.
- Reed, D.R., Tanaka, T., MCDaniel, A.H. (2006) Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiology & Behavior* 88, 215–226.

-
- Rodgers, S., Busch, J., Peters, H. and Christ-Hazelhof, E., 2005. Building a tree of knowledge: Analysis of bitter molecules. *Chemical Senses*, 30, 547-557.
- Rudnitskaya A., Nieuwoudt H.H., Muller N., Legin A., Du Toit M., Bauer F.F. (2010) Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (7) 3051-3060.
- Scott, K., (2005) Taste Recognition: Food for Thought. *Neuron* 48, 455–464.
- Soares S, Kohl S, Thalmann S, Mateus N, Meyerhof W, De Freitas V. (2013). Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *J Agric Food Chem*. 61: 1525-1533.
- Sokolowsky M., Fischer U. (2012) Evaluation of bitterness in white wine applying descriptive analysis, time-intensity analysis, and temporal dominance of sensations analysis. *Analytica Chimica Acta*, 732, 46-52.
- Upadhyaya, J., Pydi S.P., Singh N., Aluko R.E., Chelikani P., (2010) Bitter taste receptor T2R1 is activated by dipeptides and tripeptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398, 331–335.
- Vassal L., Gripon J.C. (1984) L'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert : rôle de la présure et de *Penicillium caseicolum*, moyens de la contrôler. *Le Lait*, 64, 397- 417
- Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K.L., Cook B., WU, D., Zuker C.S., Ryba N.J.P., (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293–301.

Acquisitions récentes sur l'amertume des vins rouges : contribution des composés libérés par le bois de chêne

Axel Marchal, Blandine Cretin, Lauriane Sindt, Marine Gammacurta, Pierre Waffo-Téguo et Denis Dubourdieu

Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de recherche OENOLOGIE, F-33882 Villenave d'Ornon, France
INRA, ISVV, USC 1366 OENOLOGIE, F-33882 Villenave d'Ornon, France

Introduction

Le vin est une matrice complexe, constituée de plusieurs milliers de composés dont une faible part seulement est connue. Certains d'entre eux possèdent des propriétés organoleptiques et sont responsables de l'arôme et du goût du vin. De nombreuses études ont permis de caractériser les molécules volatiles à l'origine des odeurs mais la connaissance des substances sapides du vin demeure plus incomplète. Or, le goût est le facteur prédominant influençant le choix des aliments. L'Homme peut percevoir et discriminer cinq saveurs : salé, acide, amer, sucré et umami. Cette perception des goûts a été un élément clé de sa survie. En effet, si la saveur sucrée est associée à une nourriture riche en nutriments et au goût agréable, les composés fortement amers sont souvent signes de toxicité ou de poison pour l'organisme (Chandrashekar et al., 2000). La perception amère constitue donc un rempart contre l'ingestion de molécules toxiques ou dangereuses pour l'organisme (Mueller et al., 2005). Néanmoins, l'amertume est une saveur fondamentale contribuant, avec le moelleux et l'acidité, à l'équilibre gustatif des vins rouges tel que l'a défini Emile Peynaud dans *Le Goût du Vin* (Peynaud, 1980). Son appréciation nécessite un apprentissage, ce qui en fait certainement la plus *culturelle* des saveurs. Dans les vins rouges, les déterminants moléculaires de la saveur amère proviennent en grande partie des raisins : ce sont les polyphénols, dont les propriétés organoleptiques varient considérablement en fonction de leur nature chimique. Toutefois, on observe empiriquement une modulation significative de la saveur amère des vins et des eaux-de-vie au cours de leur élevage. Ce phénomène s'explique par une libération de composés amers par le bois de chêne. Les ellagitannins ont depuis longtemps été considérés comme les principaux responsables de cette augmentation d'amertume, en dépit de l'absence de données quantitatives établissant clairement leur contribution. Une étude récente a établi leurs seuils de perception et démontré que ces tanins du chêne influençaient davantage l'astringence des vins que leur amertume (Glabasnia and Hofmann, 2006).

Les travaux présentés lors de cette journée scientifique visent à donner un éclairage moléculaire à la modification de la perception amère observée lors de l'élevage sous bois de chêne. Deux classes chimiques ont été particulièrement étudiées : les lignanes et les triterpènes. Les principaux composés de ces deux familles ont été isolés pour les caractériser chimiquement et sensoriellement. Leur implication dans les modifications gustatives consécutives à l'élevage sous bois de chêne a pu être évaluée.

Etude de la diversité structurale et des propriétés organoleptiques des lignanes du chêne

Afin de rechercher de nouvelles molécules sapides, une démarche de fractionnement guidée par le goût a été mise en œuvre au sein de notre laboratoire. Diverses techniques séparatives ont été utilisées pour fractionner un extrait de bois de chêne (extractions liquide-liquide, chromatographie de partage centrifuge, chromatographie liquide haute performance). A l'issue de chaque fractionnement, une analyse sensorielle a permis de préciser la fraction la plus sapide, qui était conservée pour l'étape

ultérieure (Marchal et al., 2011). L'application de cette méthodologie a permis d'isoler un lignane, le lyonirésinol (**Figure 1**).

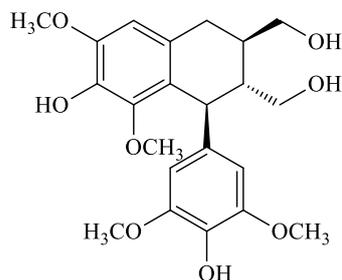


Figure 1. Structure chimique du lyonirésinol

Ce composé avait déjà été identifié dans le bois de chêne (Nabeta *et al.*, 1987) et observé dans les vins (Moutounet *et al.*, 1989), mais ses propriétés gustatives n'avaient jamais été décrites. Sa dégustation a révélé une saveur amère, particulièrement intense dans un vin, blanc comme rouge. Son seuil de détection dans le vin a été calculé à 1,5 mg/L. Le développement d'une méthode de quantification par LC-HRMS a permis de doser ce lignane dans des vins élevés sous bois. La **figure 2** présente les teneurs en lyonirésinol mesurées dans une verticale d'un même cru du Médoc.

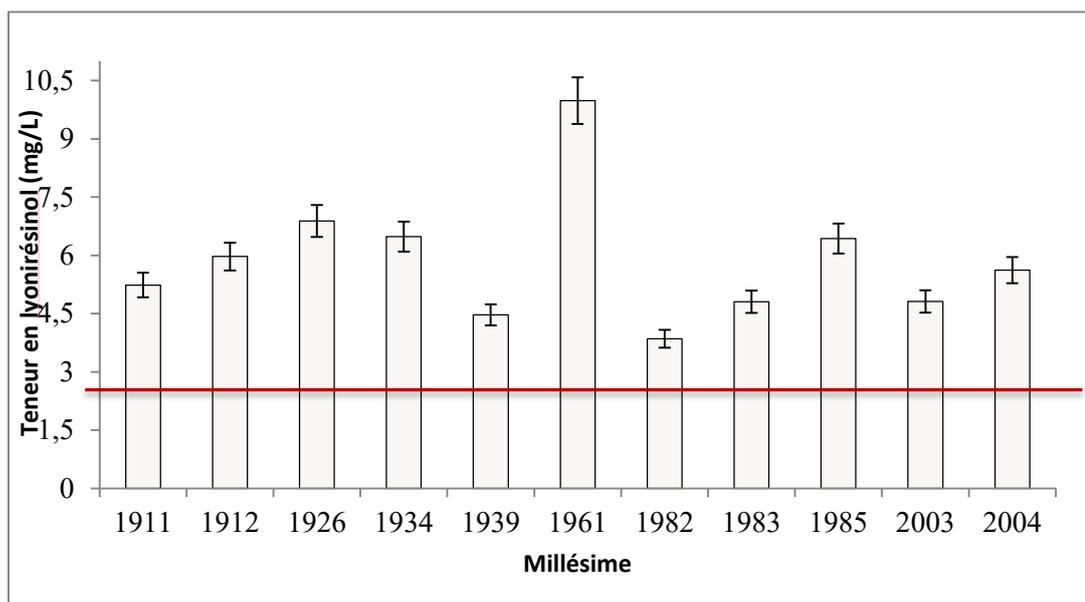


Figure 2. Concentration (en mg/L) en lyonirésinol mesurées dans différents millésimes d'un cru du Médoc. La barre rouge représente le seuil de détection

Des teneurs en lyonirésinol supérieures au seuil de détection ont été observées dans tous les vins analysés. En outre, les concentrations mesurées dans les millésimes anciens, similaires à celles des plus récents, suggèrent que ce composé est stable dans le temps. Le lyonirésinol contribue donc de façon significative et durable à l'amertume des vins rouges élevés sous bois de chêne.

Or, ce lignane est présent dans le bois de chêne sous la forme de deux énantiomères, en mélange racémique. Afin de les caractériser, des dérivés xylosylés de ces deux énantiomères ont été isolés puis

hydrolysés. Une purification par HPLC préparative a permis d'obtenir chacun des composés énantiomériquement purs. Une collaboration avec le Dr Thierry Buffeteau, de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux, a permis de déterminer la configuration absolue de chaque énantiomère. Les données expérimentales obtenues par dichroïsme circulaire vibrationnel ont été confrontées à des spectres théoriques résultant de calculs quantiques (**Figure 3**).

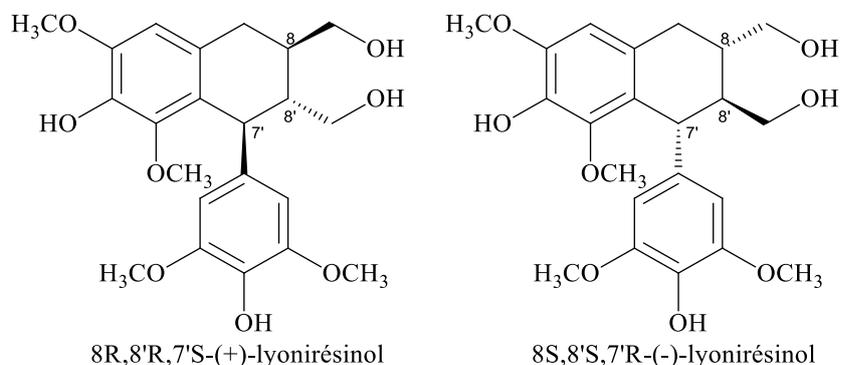


Figure 3. Structure chimique des deux énantiomères du lyonirésinol

La caractérisation sensorielle des deux énantiomères a démontré que seul le (+)-lyonirésinol était amer (Cretin *et al.*, 2015). Son seuil de détection dans le vin est de 0,46 mg/L. Le développement d'une méthode de quantification énantiospécifique a montré que ses teneurs dans les vins élevés en barriques étaient supérieures à cette valeur. Ces résultats démontrent que le (+)-lyonirésinol concourt significativement à l'amertume des vins élevés sous bois de chêne (Cretin *et al.*, 2016).

Des molécules de structures proches peuvent présenter des propriétés gustatives similaires. Or, les lignanes constituent une famille chimique peu étudiée dans le vin. Des analogues structuraux du lyonirésinol ont été recherchés dans des extraits de bois de chêne pour tenter d'identifier de nouveaux marqueurs de l'amertume. A cette fin, un extrait de bois de chêne a été criblé par LC-HRMS pour rechercher les formules brutes associées à de potentiels dérivés du lyonirésinol. L'analyse des chromatogrammes d'ions extraits correspondant aux masses théoriques de ces dérivés a révélé la présence de 11 pics chromatographiques principaux, dont 8 correspondaient à des formules brutes différentes (3 séries de 2 isomères). Un protocole de purification guidé par LC-HRMS a été développé afin d'isoler ces composés en utilisant successivement la CPC et la HPLC préparative. Huit lignanes ont ainsi été isolés et identifiés (**Figure 4**). L'un d'entre eux (**3**) n'avait jamais été observé dans la nature jusqu'à présent tandis que quatre autres sont reportés pour la première fois dans le bois de chêne (Marchal *et al.*, 2015a).

Une analyse par LC-HRMS a confirmé la présence de ces lignanes dans des vins élevés en barriques, après plusieurs années de conservation en bouteille (**Figure 5**). Les propriétés sensorielles des composés purifiés ont également été établies ; quatre d'entre eux sont amers. Le lyonirésinol s'est révélé être à la fois le plus amer et le plus abondant des lignanes du bois de chêne (**Figure 5**).

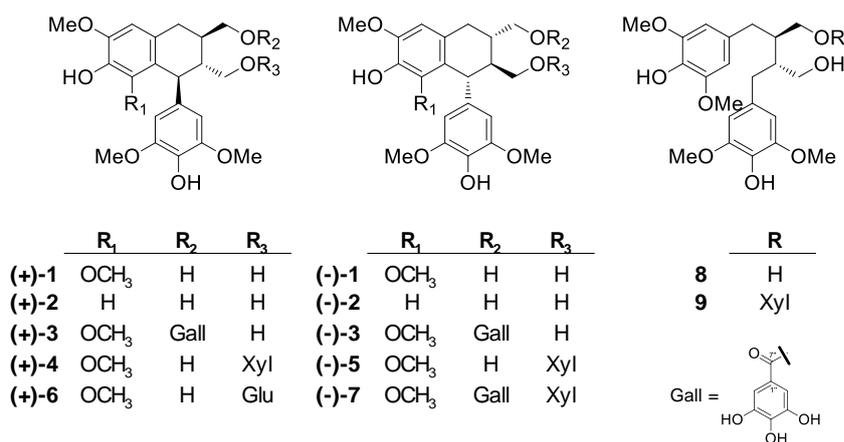


Figure 4. Structure chimique des lignanes identifiés dans le bois de chêne

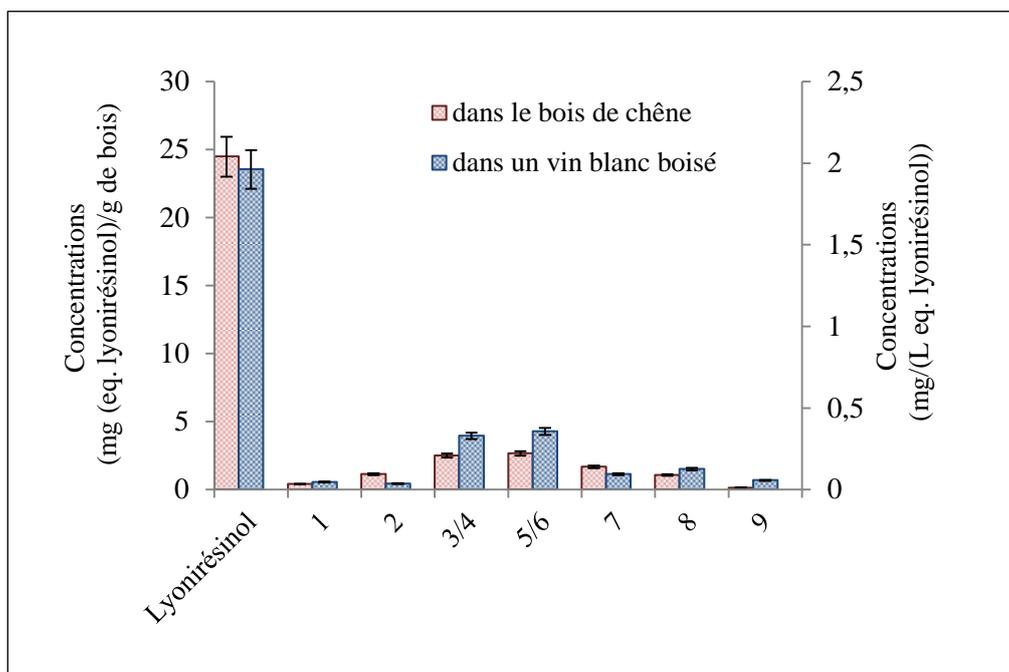


Figure 5. Concentrations des différents lignanes dans le bois de chêne et dans un vin boisé (exprimées en équivalent de lyonirésinol)

Ces travaux ont permis d'enrichir la connaissance des lignanes du chêne et d'identifier plusieurs molécules amères. Le lyonirésinol est l'un des déterminants moléculaires de l'amertume des vins élevés sous bois de chêne. L'étude de l'influence des paramètres de tonnellerie sur sa teneur est en cours et permettra de préciser les conditions de l'élevage modulant sa teneur dans les vins.

Les triterpènes du chêne : des composés sapides marqueurs de l'origine botanique

Les travaux entrepris sur la sucrosité des vins secs ont permis d'identifier deux triterpènes sucrés : les quercotriterpénosides I et II (Marchal *et al.*, 2011). Des analogues structuraux ont été recherchés dans le bois de chêne par criblage en LC-HRMS. Au total, une quarantaine de molécules ont été isolées et caractérisées, dont 23 n'avaient jamais été identifiées précédemment et 12 autres jamais observées dans les vins (Marchal *et al.*, 2015b). Les triterpènes du chêne peuvent être classés en deux catégories : certains, comme les QTT, possèdent des propriétés édulcorantes tandis que d'autres sont amers. C'est notamment le cas du dérivé glucosylé de l'acide bartogénique (Glu-AB), identifié par Arramon *et al.* (2002). Une méthode de dosage par LC-HRMS des composés majoritaires de chaque catégorie a été mise au point (Figure 6).

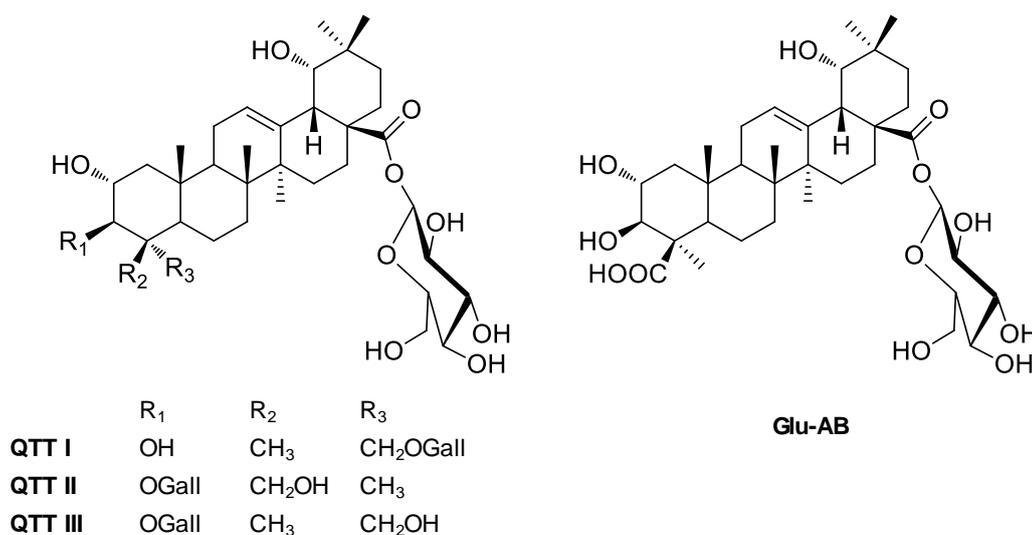


Figure 6. Structure chimique des QTT (sucrés) et du Glu-AB (amer)

Afin d'étudier l'influence de l'espèce de chêne sur la concentration en triterpènes sapides du bois, 46 échantillons ont été prélevés dans 8 forêts françaises (Marchal *et al.*, 2016). L'identification de l'espèce a été réalisée selon une méthode génétique développée par l'UMR BIOGECO (Guichoux *et al.*, 2011; Guichoux *et al.*, 2013). Pour chaque origine géographique, des échantillons ont été affectés aux deux espèces (27 de chêne sessile, 19 de chêne pédonculé). Ils ont été analysés par LC-HRMS pour quantifier les triterpènes.

Les quatre triterpènes ont été observés dans tous les échantillons, à des concentrations variant de quelques µg/g à plus d'un mg/g de bois. L'application d'un test de Kruskal-Wallis a montré des différences de concentrations significatives entre les espèces. Les teneurs moyennes en QTT étaient plus élevées dans les échantillons de chêne sessile que dans ceux de chêne pédonculé (Figure 7). A l'inverse, le chêne pédonculé contenait davantage de Glu-AB. Cette tendance était identique pour des échantillons provenant de la même forêt, suggérant que l'origine botanique du chêne influence davantage la composition triterpénique du bois que la provenance géographique. Pour chaque composé, une forte variabilité inter-individuelle a été observée au sein d'une même espèce. Une hétérogénéité similaire a été décrite pour la whisky-lactone, plus abondante dans le chêne sessile (Prida *et al.*, 2007), ou encore les ellagitannins, plus présents dans le bois de chêne pédonculé (Masson *et al.*, 1995; Prida *et al.*, 2006).

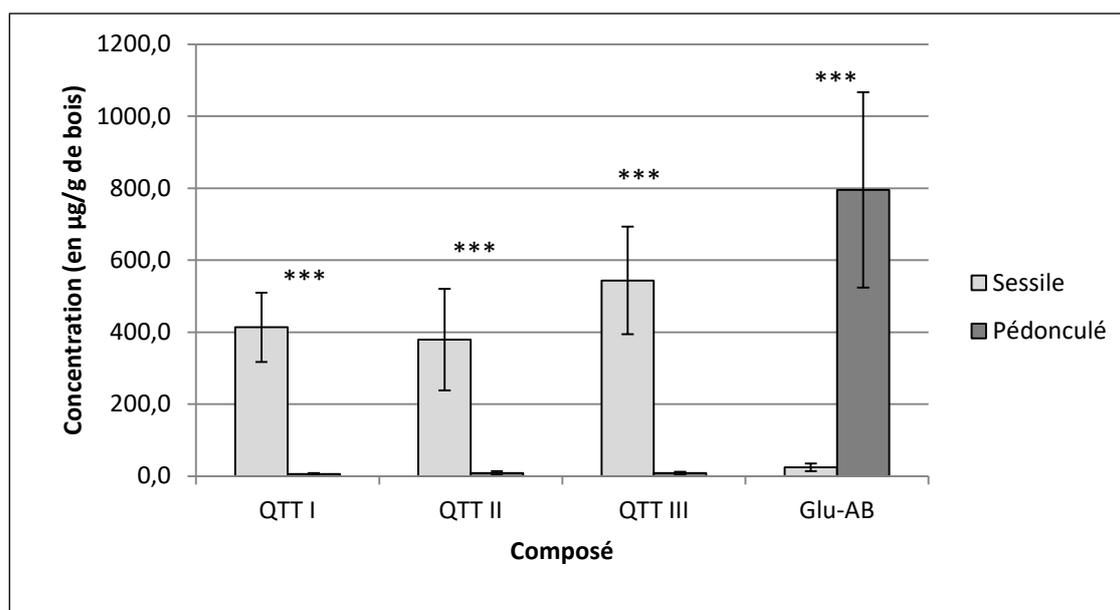


Figure 7. Concentrations moyennes en QTT I, II, III et en Glu-AB mesurées dans les échantillons de bois de chêne sessile et pédonculé. Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance à 5 %.

Ces résultats ont établi l'influence notable de l'espèce de chêne sur la présence en composés triterpéniques et suggéré ses conséquences sensorielles. Le chêne sessile est en effet plus riche en triterpènes sucrés (QTT) tandis que le chêne pédonculé contient davantage de triterpènes amers (Glu-AB). Un indice triterpénique, défini comme le logarithme du rapport des concentrations en QTT et en Glu-AB, a été calculé pour chaque échantillon. L'analyse des résultats a montré que cet indice permettait de discriminer l'espèce de chêne avec certitude. Il s'agit de la première méthode chimique d'identification de l'origine botanique du chêne ; elle peut être appliquée sur du bois frais, mais aussi séché et même chauffé.

Cette méthode a été utilisée pour mettre en place une expérimentation étudiant l'incidence de l'espèce de chêne utilisée pour la fabrication des barriques sur le goût du vin. Deux modalités ont été fabriquées : des barriques uniquement de chêne sessile et des barriques « mixtes », mêlant les deux espèces, comme on en rencontre dans les caves. Après mise en bouteille, une amertume significativement plus intense a été perçue dans les vins élevés en barriques « mixtes ». Ces travaux ont ainsi montré que le choix de l'espèce de chêne utilisée pour fabriquer les barriques avait une incidence sur le goût du vin, et en particulier sur son amertume.

Conclusion

La recherche des déterminants moléculaires de l'amertume conférée par l'élevage sous bois de chêne a conduit à l'identification de plusieurs lignanes et triterpènes. Certains de ces composés, libérés dans le vin à des teneurs variant en fonction des conditions de l'élevage, en modifiant significativement le goût. L'amélioration de la connaissance de la composition du bois ouvre de nombreuses perspectives d'applications pratiques visant à une meilleure maîtrise de l'élevage et de ses conséquences organoleptiques.

Références

- Arramon G, Saucier C, Colombani D, Glories Y (2002) Identification of triterpene saponins in *Quercus robur* L. *Q. petraea* Liebl. heartwood by LC-ESI/MS and NMR. *Phytochem Anal* 13:305–310
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJP (2000) T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell* 100:703–711 . doi: 10.1016/S0092-8674(00)80706-0
- Cretin BN, Dubourdiou D, Marchal A (2016) Development of a quantitation method to assay both lyoniresinol enantiomers in wines, spirits, and oak wood by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 408:3789–3799 . doi: 10.1007/s00216-016-9466-3
- Cretin BN, Sallembien Q, Sindt L, Daugey N, Buffeteau T, Waffo-Tégou P, Dubourdiou D, Marchal A (2015) How stereochemistry influences the taste of wine: Isolation, characterization and sensory evaluation of lyoniresinol stereoisomers. *Anal Chim Acta* 888:191–198 . doi: 10.1016/j.aca.2015.06.061
- Glabasnia A, Hofmann T (2006) Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *J Agric Food Chem* 54:3380–3390
- Guichoux E, Garnier-Géré P, Lagache L, Lang T, Boury C, Petit RJ (2013) Outlier loci highlight the direction of introgression in oaks. *Mol Ecol* 22:450–462 . doi: 10.1111/mec.12125
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Léger P, Petit RJ (2011) Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Mol Ecol Resour* 11:578–585 . doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02983.x
- Marchal A, Cretin BN, Sindt L, Waffo-Tégou P, Dubourdiou D (2015a) Contribution of oak lignans to wine taste: Chemical identification, sensory characterization and quantification. *Tetrahedron* 71:3148–3156 . doi: 10.1016/j.tet.2014.07.090
- Marchal A, Génin E, Waffo-Tégou P, Bibès A, Da Costa G, Mérillon J-M, Dubourdiou D (2015b) Development of an analytical methodology using Fourier transform mass spectrometry to discover new structural analogs of wine natural sweeteners. *Anal Chim Acta* 853:425–434 . doi: 10.1016/j.aca.2014.10.039
- Marchal A, Prida A, Dubourdiou D (2016) New Approach for Differentiating Sessile and Pedunculate Oak: Development of a LC-HRMS Method To Quantitate Triterpenoids in Wood. *J Agric Food Chem* 64:618–626 . doi: 10.1021/acs.jafc.5b05056
- Marchal A, Waffo-Tégou P, Génin E, Mérillon JM, Dubourdiou D (2011) Identification of new natural sweet compounds in wine using centrifugal partition chromatography-gustatometry and Fourier transform mass spectrometry. *Anal Chem* 83:9629–9637
- Masson G, Moutounet M, Puech JL (1995) Ellagitannin Content of Oak Wood as a Function of Species and of Sampling Position in the Tree. *Am J Enol Vitic* 46:262–268
- Moutounet M, Rabier PH, Puech JL, Verette E, Barillere JM (1989) Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Sci Aliments* 9:35–51
- Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJP (2005) The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434:225–229 . doi: 10.1038/nature03352
- Nabeta K, Yonekubo J, Miyake M (1987) Phenolic compounds from the heartwood of European oak (*Quercus robur* L.) and brandy. *Mokuzai Gakkaishi* 33:408–415
- Peynaud E (1980) *Le Goût du Vin*. Dunod, Paris
- Prida A, Boulet JC, Ducouso A, Nepveu G, Puech JL (2006) Effect of species and ecological conditions on ellagitannin content in oak wood from an even-aged and mixed stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. *Ann For Sci* 63:415–424
- Prida A, Ducouso A, Petit RJ, Nepveu G, Puech JL (2007) Variation in wood volatile compounds in a mixed oak stand: Strong species and spatial differentiation in whisky-lactone content. *Ann For Sci* 64:313–320

Etude des facteurs influençant l'amertume des vins blancs par l'analyse sensorielle

Soline Caillé¹, Catherine Chabalier¹, Alain Samson^{1,2}

¹ INRA – UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, Montpellier, France

² INRA – UE 999 Pech Rouge, Gruissan, France

Introduction

L'amertume est un critère important dans l'acceptation des produits alimentaires et des boissons car elle serait associée, de manière innée, à des produits toxiques ou dangereux pour la santé de l'homme (Pandey *et al.*, 2010).

Dans le vin, l'amertume est un des paramètres majoritaires pour définir le goût ; elle participe à l'équilibre général avec l'acidité et la sucrosité. Si l'amertume des vins rouges trouve son origine majeure dans leurs richesses en polyphénols dont on sait que certaines conformations de ces molécules peuvent l'exacerber (Noble, 1994), l'amertume des vins blancs est beaucoup plus controversée. Mieux comprendre son origine et agir éventuellement sur son niveau est un enjeu pour la filière afin de répondre aux attentes des consommateurs, de plus en plus sensibles à de faibles niveaux de défaut dans les vins (Leigh, 2010).

Certains cépages tels que le muscat à petits grains, le viognier ou le mauzac sont reconnus pour apporter plus fréquemment de l'amertume aux vins. En outre, ces cépages sont particulièrement sensibles à l'oxydation, qui renforcerait elle-même cette sensation (Nagel & Graber, 1988). D'autres facteurs engendreraient l'amertume : la concentration en certaines molécules, tel que l'alcool, les terpènes ou l'acroléine (Noble *et al.*, 1988 ; Noble, 1994 ; Bauer *et al.*, 2010), ou l'équilibre des perceptions gustatives. L'astringence peut par exemple perturber la perception de l'amertume (Brannan *et al.*, 2001). A l'inverse, des paramètres peuvent diminuer cette perception comme l'acidité (Kallithraka *et al.*, 1997), le taux de sucre ou de glycérol (Smith *et al.*, 1996 ; Fontoin *et al.*, 2008).

Pour diminuer l'amertume des vins blancs, des pratiques œnologiques sont bien connues. C'est le cas des collages comme avec la PVPP (poly vinyl poly pyrrolidone), qui se lie aux polyphénols (Caillet, 2006) ou l'édulcoration des vins au conditionnement. Cependant, ces solutions sont correctives et ne permettent pas de comprendre l'origine d'une amertume excessive afin de la prévenir.

Cette étude se propose d'identifier certains facteurs inhérents au raisin ou à la vinification impactant l'amertume des vins blancs pour mieux en comprendre son origine et mettre en place des actions préventives le plus en amont possible.

Matériel et Méthodes

Les dispositifs expérimentaux mis en place lors de cette étude permettent d'étudier l'influence de deux facteurs marquant l'amertume des vins : le taux d'alcool et l'extraction de composés lors d'une macération pelliculaire (**Tableau 1**).

Les études ont été menées sur trois cépages : le muscat, le mauzac et le viognier, qui ont été identifiés comme des cépages qui communiquent fréquemment de l'amertume aux vins, lors d'une enquête faite en 2013, auprès de trente professionnels de la filière en Languedoc Roussillon.

Tableau 1. Description des dispositifs expérimentaux

Millésime	Cépage	Dispositif expérimental <i>Facteur taux d'alcool</i>	Dispositif expérimental <i>Facteur Extraction de composés</i>
2013	Muscat	2 dates de récolte Ajout de MCR	Pressurage direct Décanteur centrifuge Macération pelliculaire avant décanteur centrifuge
2013	Viognier	2 dates de récolte Ajout de MCR	Pressurage direct Décanteur centrifuge Macération pelliculaire avant décanteur centrifuge
2014	Muscat	2 dates de récolte	Décanteur centrifuge Macération pelliculaire avant décanteur centrifuge
2014	Mauzac	2 dates de récolte Effeillage de la vigne	
2015	Muscat	2 dates de récolte	Décanteur centrifuge Macération pelliculaire avant décanteur centrifuge
2015	Mauzac	2 dates de récolte Effeillage de la vigne	
2016	Mauzac	2 dates de récolte Ajout de MCR	

L'analyse sensorielle des vins est réalisée par un jury expert (20 juges), sélectionné sur ses aptitudes sensorielles et entraîné (AFNOR ISO 8586). Les juges sont entraînés à identifier et évaluer l'intensité de l'amertume par l'utilisation de solutions standards (caféine, sulfate de quinine et L-phénylalanine). L'intensité de l'amertume est évaluée sur une échelle linéaire, continue et bornée. Les vins sont présentés en comparatif, selon un ordre basé sur un carré latin équilibré sur les effets arrières (Macfie *et al.*, 1989) et dans des verres noirs standardisés INAO. Une répétition de l'analyse des vins est réalisée. Les données sont recueillies avec un système d'acquisition de données informatisé (FIZZ software, Biosystemes, Couternon France).

Le traitement statistique est réalisé avec le logiciel XLstat (Addinsoft, France), par des analyses de variances. Au préalable, les performances du jury (discrimination, répétabilité et consensus) sont vérifiées. Lorsque des différences significatives sont observées ($p < 0,05$), les intensités moyennes sont comparées en utilisant le test de comparaison multiple Tukey (HSD). Des corrélations de Pearson sont calculées entre les données issues de l'analyse sensorielle et les données œnologiques des vins.

Résultats et Discussion

La maturité correspond au ratio sucre/acide des baies de raisin avant récolte mais pendant la maturation, une modification plus complexe de la composition physico-chimique (arômes, polyphénols ...) des raisins se produit. C'est pour cela que l'ajout de moût concentré rectifié (MCR) en cours de fermentation a également été réalisé, afin de mesurer de façon plus indépendante l'augmentation de la perception de l'amertume avec le degré alcoolique.

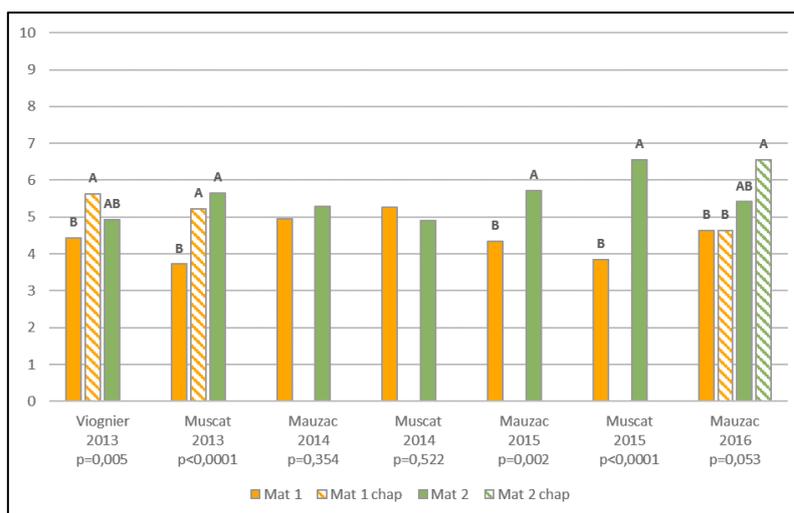


Figure 1. Effet de la maturité et l'ajout de MCR sur l'amertume

Pour l'ensemble des millésimes, excepté en 2014, pour lequel l'écart de maturité entre les deux dates de récoltes était plus faible que les autres millésimes, nous constatons des différences d'amertume significatives entre les deux maturités, avec une amertume plus prononcée pour la 2^{ème} maturité.

En ce qui concerne l'ajout de MCR, pour le millésime 2013, une différence d'amertume est observée. En effet, les vins issus de la première maturité additionnés de MCR sont perçus aussi amers que les vins issus de la deuxième maturité. En 2016, l'effet est moins marqué.

Tableau 2. Corrélation de Pearson entre les données œnologiques et l'amertume

	Viognier 2013	Muscat 2013	Mauzac 2014	Muscat 2014	Mauzac 2015	Muscat 2015	Mauzac 2016
Alcool	0,544	0,929	0,604	-0,099	0,72	0,99	0,961
Acidité totale	-0,287	-0,496	-0,592	-0,37	0,23	0,99	-0,954
pH	0,085	0,35	0,129	-0,393	0,42	0,95	0,853

Les corrélations effectuées avec les données œnologiques, nous permettent de confirmer les résultats de la recherche bibliographique sur le lien entre l'alcool et l'amertume (Noble, 1994). En effet, nous observons des corrélations globalement significatives entre ces deux critères. Plus le Titre Alcoométrique Volumique (TAV) est élevé et plus le vin est amer. Nous ne pouvons toutefois pas conclure que l'alcool est le seul responsable de l'augmentation d'amertume ; l'hypothèse qu'il doit agir en interaction avec d'autres composés du vin reste à explorer.

De plus, les corrélations entre la perception de l'amertume, l'acidité totale et le pH des vins ne sont pas significatives. Ce qui confirme également que le pH et l'acidité totale n'ont pas d'effet significatif sur la perception amère (Noble, 1994 ; Fontoin *et al.*, 2008).

On peut donc conclure que le fait de récolter le raisin plus tardivement augmente l'amertume du vin avec une probabilité plus élevée. C'est certainement l'accroissement de la concentration en sucre dans les baies avec la maturité, et donc du taux d'alcool, dans les vins qui est le facteur principal d'augmentation de l'amertume.

Un autre dispositif expérimental mis en place pour observer l'effet de la maturité est l'effeuillage. Celui-ci consiste à enlever une partie des feuilles pour exposer davantage les grappes au soleil et ainsi accélérer la maturation des baies tout en favorisant la synthèse de certains composés précurseurs d'arômes. Cette technique a été mise en œuvre suite à l'enquête de 2013 auprès des professionnelles de la filière, qui indiquait que les années plus ensoleillées produisaient plus fréquemment des vins plus amers. Cela a donc été réalisé par un effeuillage sur une vigne de cépage mauzac.

De plus, des études ont pu montrer que le fait d'effeuiller tôt permettait d'avoir des vins plus riches en composés phénoliques (ENTAV-ITV France, 2007). On peut donc supposer que le raisin est exposé à une sur-maturation au moment de la récolte, contrairement aux vignes non effeuillées. Cela va dans le même sens que les résultats de la thèse de Jérôme Pillet (2011), concernant la quantité de flavonols qui s'accumuleraient lors d'une surexposition au soleil.

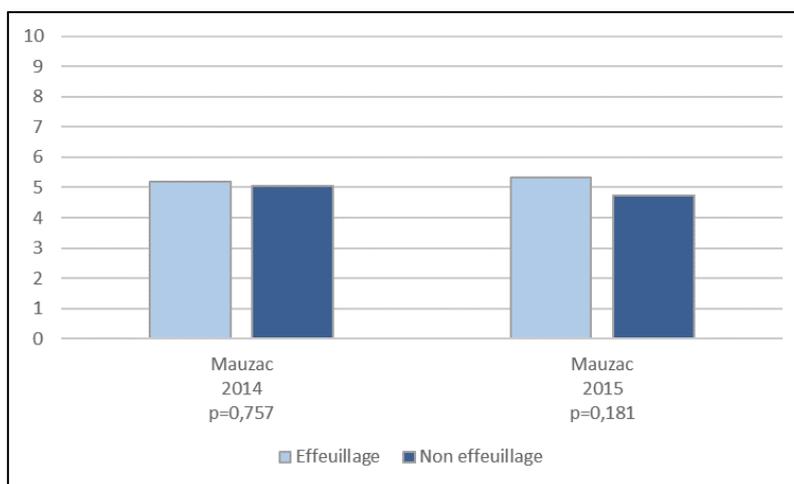


Figure 2. Effet de l'effeuillage sur l'amertume

Pour les deux millésimes, aucune différence significative d'amertume entre les vins issus de vignes effeuillées ou non effeuillées n'a été observée (**Figure 2**). Toutefois pour le millésime 2015, on observe une tendance : le vin effeuillé est perçu un peu plus amer. Nous ne pouvons donc pas confirmer le rôle de l'exposition au soleil sur la quantité de flavonols dans les raisins et son lien avec l'amertume des vins. Il faut noter qu'en 2014 l'effeuillage a été effectué trop tardivement dans le cycle végétatif de la vigne pour avoir un impact optimum.

Le deuxième facteur étudié : la macération pelliculaire, permet, quant à elle une extraction accrue de certains composés dans le moût en fonction de sa durée et de la température des baies. Il s'agit de voir si des composés extraits plus abondamment lors de cette macération seraient responsables de l'amertume des vins blancs. C'est le cas par exemple des acides phénols (Vérette *et al.*, 1988; Peleg et Noble, 1995). Dans notre expérimentation, la macération est favorisée par un mélangeur/homogénéisateur horizontale réglable en température et un système centrifuge de foulage dont le principe consiste en un éclatement des baies sur une paroi.

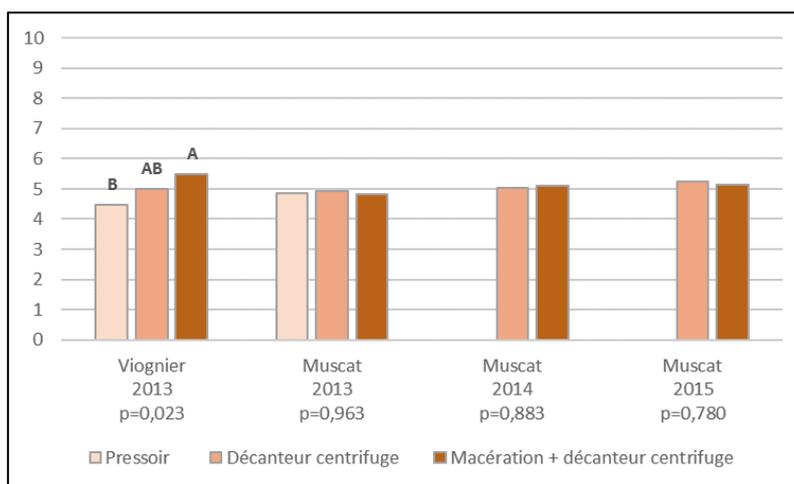


Figure 3. Effet de la macération pelliculaire sur l'amertume

Aucune différence significative d'amertume n'a été perçue entre les vins issus du décanteur centrifuge et ceux issus de la macération pelliculaire préalable à l'extraction des jus avec un décanteur centrifuge. La seule différence significative d'amertume a été perçue, pour le cépage viognier en 2013, entre le vin avec un pressurage des baies dans un pressoir pneumatique et celui où les baies ont subi une macération suivie d'une extraction des jus avec un décanteur centrifuge.

Le fait de macérer le raisin avant l'extraction n'a pas eu un impact significatif sur l'amertume du vin. L'hypothèse que cette macération aurait permis une libération accrue de composés des éléments solides de la baie (pellicule, pépins) et que ces composés soient responsables d'une augmentation de l'amertume n'est donc pas vérifiée.

Le choix du cépage muscat a été déterminé par l'hypothèse que les composés terpéniques auraient une influence sur l'amertume. Ceci en se basant sur les travaux de Noble *et al.* (1988), qui stipule que l'amertume serait due aux terpènes aglycones ou à d'autres constituants. Des analyses de terpènes (linalol, nérol et géraniol) ont donc été réalisées sur les vins de muscat, millésime 2013. Les corrélations entre les concentrations de ces trois composés et la perception de l'amertume ne sont pas significatives et ne permettent de vérifier cette hypothèse.

Conclusion

Lors de cette étude, nous avons étudié l'influence de deux facteurs sur l'amertume des vins : le taux d'alcool et la macération pelliculaire. Pour cela plusieurs expérimentations ont été mises en place pendant quatre millésimes.

Une maturité plus élevée du raisin ainsi que l'ajout de MCR en cours de fermentation communiquent aux vins plus d'amertume. Celle-ci peut être reliée notamment à la quantité d'alcool contenu dans le vin. Par contre, l'effeuillage qui permettrait une exposition plus importante au soleil, n'influence pas significativement l'amertume des vins, même si une tendance a été observée en 2015. Enfin, la macération pelliculaire avec une extraction plus poussée de composés du raisin n'a pas montré une perception accrue de l'amertume des vins.

Tout en étudiant des critères technologiques pouvant faire varier l'amertume des vins blancs, nous explorons une nouvelle piste d'identification de composés responsables d'amertume dans les vins : les peptides. Dans ce cadre, le lien peptide/amertume a été analysé sur les vins. Des premiers résultats sont encourageants mais le programme en cours ne nous permet pas aujourd'hui de présenter de résultats.

Références

- AFNOR ISO 8586. (1994), Analyse sensorielle – guide général pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets. AFNOR.
- Bauer R., Cowan A., Crouch, A. (2010), Importance of 3-Hydroxypropionaldehyde and Derivatives in Production and Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3243–3250.
- Brannan G.D., Setser C S., Kemp K.E. (2001), Interaction of astringency and taste characteristics. *Journal of Sensory Studies*, 2, 179–197.
- Caillet M.A. (2006), Historique du collage, le collage des moûts et des vins : principe, résultats et perspectives. *Revue française d'oenologie*, 217.
- Fontoin H., Saucier C., Teissedre P.L. et al. (2008), Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* 19(3): 286-291.
- Kallithraka S., Bakker J., Clifford M.N., (1997). Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. *Journal of Food Science*, 62, 416-420
- Leigh F. (2010), Linking wine flavour components, sensory properties and consumer quality perceptions. *The Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 25 (5), 18-23.
- Mac Fie H., Bratchell M., Greenhoff K., et al. (1989), Designs to balance the effect of order of presentation and first order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4, 129-148.
- Nagel C., Graber W. (1988), Effect of must oxygenation on quality of white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39, 1-4.
- Noble A.C. (1994), Bitterness in wine. *Physiology & Behavior*, 56 (6), 1251-1255.
- Noble A.C., Strauss C., Williams P. et al. (1988), Contribution of terpene glycosides to bitterness in Muscat wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 129-131.
- Pandey S., Kumar S., Prajapati S.K., et al. (2010), An overview on taste physiology and masking of bitter drugs. *International Journal of Pharma and Bio sciences*, 1 (3).
- Peleg, H., & Noble, A. (1995). Perceptual properties of benzoic acid derivatives. *Chemical Senses*, 20, 393-440.
- Pillet J. (2011). Impact du microclimat sur le métabolisme de la baie de raisin. Thèse : biologie végétale. Bordeaux : Université Victor Segalen Bordeaux. 198.
- Smith A.K., June H., Noble A.C. (1996), Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin. *Food Quality and Preference*, 3-4, 161-166.
- Vérette, E., Noble, A., & Somers, T. (1988). Hydroxycinnamates of *Vitis vinifera*: sensory assessment in relation to bitterness in white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45, 267-272.

Intérêt de l'utilisation des dérivés de levure en œnologie

Julie Mekoue Nguela¹, Nathalie Sieczkowski¹, Céline Poncet-Legrand², Stéphanie Roi², Jean-Marc Brillouet², Aude Vernhet²

¹Lallemand SAS, 19 rue des Briquetiers, BP 59, 31 702 Blagnac, France

²UMR Sciences Pour l'Œnologie-Montpellier-France

Introduction

Les dérivés de levure constituent aujourd'hui une large famille d'auxiliaires de vinification communément employés à différents stades du processus de vinification. Ce sont les écorces de levures qui ont d'abord été utilisées pour la détoxification des moûts et des vins dans le but d'une meilleure maîtrise des fermentations alcooliques et malo-lactiques (1). Puis, en complément, les levures inactivées sont entrées dans la composition d'activateurs complexes de fermentation en diversifiant les sources azotées de nutriments sur une composante organique (source d'acides aminés...) (2). Puis dès le début des années 2000, les levures inactivées spécifiques (LIS) ont vu le jour. Leur développement s'est fortement inspiré de l'élevage traditionnel sur lies et des contributions des lies de levures à la qualité des vins liées notamment à leur pouvoir anti-oxydant et à la libération de composés d'intérêt (mannoprotéines...). Différents procédés de nature mécanique, physico-chimique ou enzymatique sont mis en oeuvre pour l'obtention de fractions de composition et de propriété différentes.

Révelant ainsi le potentiel immense de la levure en composés d'intérêt œnologique, les LIS ont rapidement trouvé leur utilité sur tout le processus de vinification pour différentes applications depuis le raisin jusqu'au vin fini :

- Protection des moûts et des vins contre l'oxydation (levures inactivées riches en glutathion),
- Protection et nutrition des levures et des bactéries au cours des fermentations alcooliques et malolactiques respectivement (autolysats de levure, levures inactivées, écorces de levure),
- Adsorption des composés toxiques/indésirables en fermentation ou en élevage (écorces de levure),
- Alternative à l'élevage sur lies (levures inactivées spécifiques),
- Collage pour les opérations de clarification, de stabilisation et d'affinage (extraits protéiques de levure),
- Stabilisation tartrique des vins (mannoprotéines).

Malgré un intérêt croissant pour l'utilisation des LIS en œnologie, les mécanismes exacts impliqués dans leur effet potentiel sur les vins (clarification, caractéristiques sensorielles et stabilité) restent mal connus. Ceci est lié : i) à la composition complexe des LIS, qui peuvent inclure du matériel intracellulaire de levure et des constituants pariétaux et ii) à la complexité de la matrice vin. Dans le contexte de la vinification en rouge, l'impact des LIS est principalement attribué aux interactions avec les composés phénoliques. Mais les modes d'action et les fractions impliquées aussi bien dans les LIS que dans les polyphénols restent peu identifiés. Ce travail présente les travaux de recherche réalisés à l'INRA de Montpellier (UMR SPO) dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre LIS et polyphénols dans le contexte de la vinification en rouge, et de progresser dans l'identification des fractions actives et des polyphénols impliqués. Nous présenterons ici les travaux de recherche portant sur : i) la sorption des polyphénols par les levures dans le contexte de l'élevage sur lies et ii) les interactions entre un extrait protéique de levure et les polyphénols dans le contexte du collage.

Adsorption des polyphénols par les LIS dans le contexte de l'élevage

L'adsorption d'un pool de polyphénols purifié d'un vin rouge (Merlot) par la biomasse morte d'une souche de levure œnologique *Saccharomyces cerevisiae* a été étudiée et comparée à celle des parois cellulaires purifiées après broyage mécanique de la levure (3). Les expériences ont été réalisées en solution modèle vin, en présence de 10^8 cellules/mL et des concentrations initiales en polyphénols variant de 0,01 à 5 g/L. Après 24 h de contact, les résultats ont mis en évidence une forte capacité des cellules entières à adsorber irréversiblement des quantités importantes de polyphénols, principalement les oligomères et les polymères de tanins et pigments dérivés (3). Les quantités fixées étaient de l'ordre de 200 mg de tanins et pigments dérivés par gramme de levures sèches (**Figure 1**). Seules des interactions très faibles ont été observées pour les parois cellulaires correspondantes, les quantités adsorbées étaient environ 10 fois moins importantes que celles observées avec les levures entières (**Figure 1**).

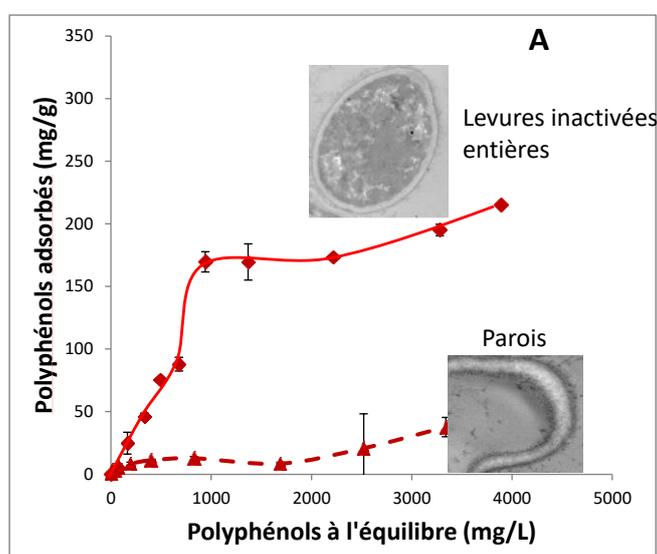


Figure 1A. Isothermes d'adsorption du pool de polyphénol purifié d'un vin rouge (Merlot) par des levures entières inactivées et par les parois purifiées correspondantes.

Ces résultats ont soulevé la question du rôle réel joué par les parois cellulaires dans la capacité de la levure de fixer les tanins. Pour répondre à cette question, la microscopie électronique à transmission (**Figure 1B et C**) et la microscopie confocale (**Figure 1D et E**) ont été utilisées pour identifier les compartiments cellulaires impliqués dans les interactions avec les polyphénols (4). Les résultats ont montré que si les tanins interagissent avec les parois cellulaires, et en particulier avec les mannoprotéines (**Figure 1C**), la majeure partie des polyphénols passent à travers la paroi cellulaire et la membrane plasmique des cellules mortes pour interagir avec leurs composants intracellulaires (**Figure 1E**) (4). Ces résultats ont apporté de nouvelles informations concernant les tanins et leurs interactions avec la levure au cours de l'élevage des vins, démontrant ainsi que les interactions entre ces dernières et les polyphénols ne sont pas limitées à la paroi cellulaire, mais impliquent également et de façon plus importante les compartiments plus internes de la levure. Cette accumulation importante des tanins à l'intérieur des levures mortes présente la levure inactivée comme un vrai outil alternatif à l'élevage sur lies pour la réduction de l'astringence des vins rouges.

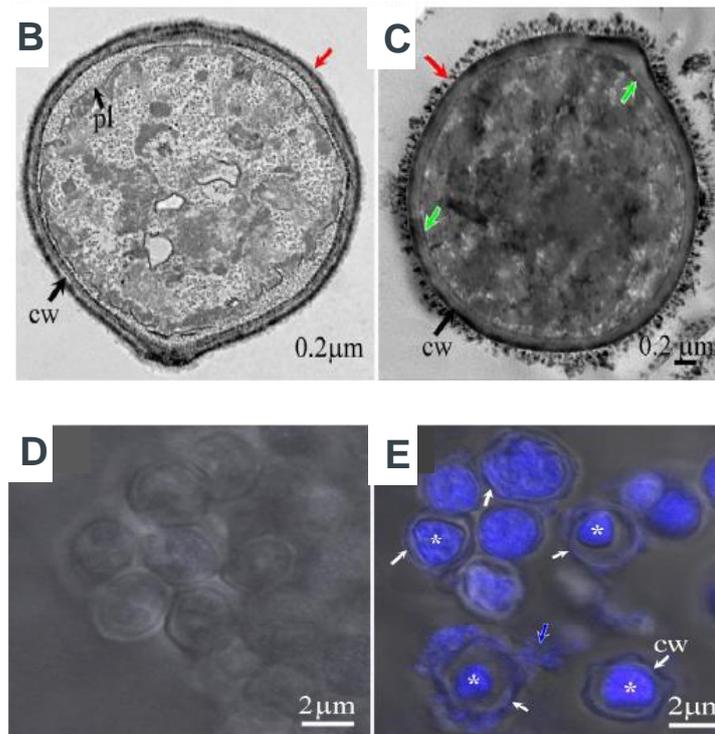


Figure 1. Images de microscopie électronique à transmission de la levure sans polyphénol (B) et de la levure en présence de polyphénols de vin (C). Images de microscopie confocale de la levure sans polyphénol (D) et de la levure en présence de polyphénols de vin (E).

Interactions entre un extrait protéique de levure et les polyphénols dans le contexte du collage

Les mécanismes d'interaction entre un extrait protéique de levure issu de *Saccharomyces cerevisiae* et les polyphénols ont été étudiés en milieu modèle vin et avec une fraction de tanins natifs de pellicules de raisin d'un degré de polymérisation moyen (DPM) 27 (appelée **TP27**) à l'aide d'expériences d'adsorption/agrégation et d'analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et calorimétrie de titration isotherme (ITC) (5). L'EPL utilisé ici est un mélange de composés intracellulaires et pariétaux, les macromolécules solubles étaient des protéines, mais aussi des mannoprotéines et des β -glucanes. Afin de mieux explorer les interactions EPL-tanins, ainsi que la part des mannoprotéines et des β -glucanes, des expériences d'ITC et de DLS ont été effectuées avec la fraction soluble de l'EPL, une solution commerciale de mannoprotéines de hauts poids moléculaires (> 10 kDa) purifiées de *Saccharomyces cerevisiae* et une chaîne linéaire de β -glucane purifiée à partir d'algues (Laminarine). L'ITC, réalisée à 25°C, a permis de mesurer les changements d'enthalpie associés aux interactions entre les macromolécules (concentration 4 g/L) et les tanins (concentration 5 g/L). L'intensité de la chaleur dégagée et la pente des courbes de titration (**Figure 2 A, C et E**) montrent une plus forte interaction des tanins avec l'EPL par comparaison aux mannoprotéines et aux β -glucanes. La DLS permet de mettre en évidence les phénomènes d'agrégation et d'en suivre les cinétiques. Les expériences ont été réalisées à 25 °C pour des concentrations de tanins et de macromolécules fixées à 0,4 g/L. La **figure 2** (B, D et F) présente le diamètre hydrodynamique (D_H) des particules en suspension dans les échantillons avant interaction et dans le mélange après interaction. L'ajout de l'EPL dans la solution de tanins a conduit à la formation d'agrégats dont la taille augmente très rapidement et qui sédimentent spontanément au bout de 24 h (**Figure 2B**). Les résultats obtenus avec la laminarine ne montrent pas d'interactions avec les tanins conduisant à une agrégation (**Figure 2F**). Avec les mannoprotéines, les résultats montrent qu'il existe des interactions entre ces dernières et les tanins, conduisant à la formation d'agrégats.

Cependant, la taille de ces agrégats restent stable au cours du temps et aucune sédimentation n'a été observée (**Figure 2D**).

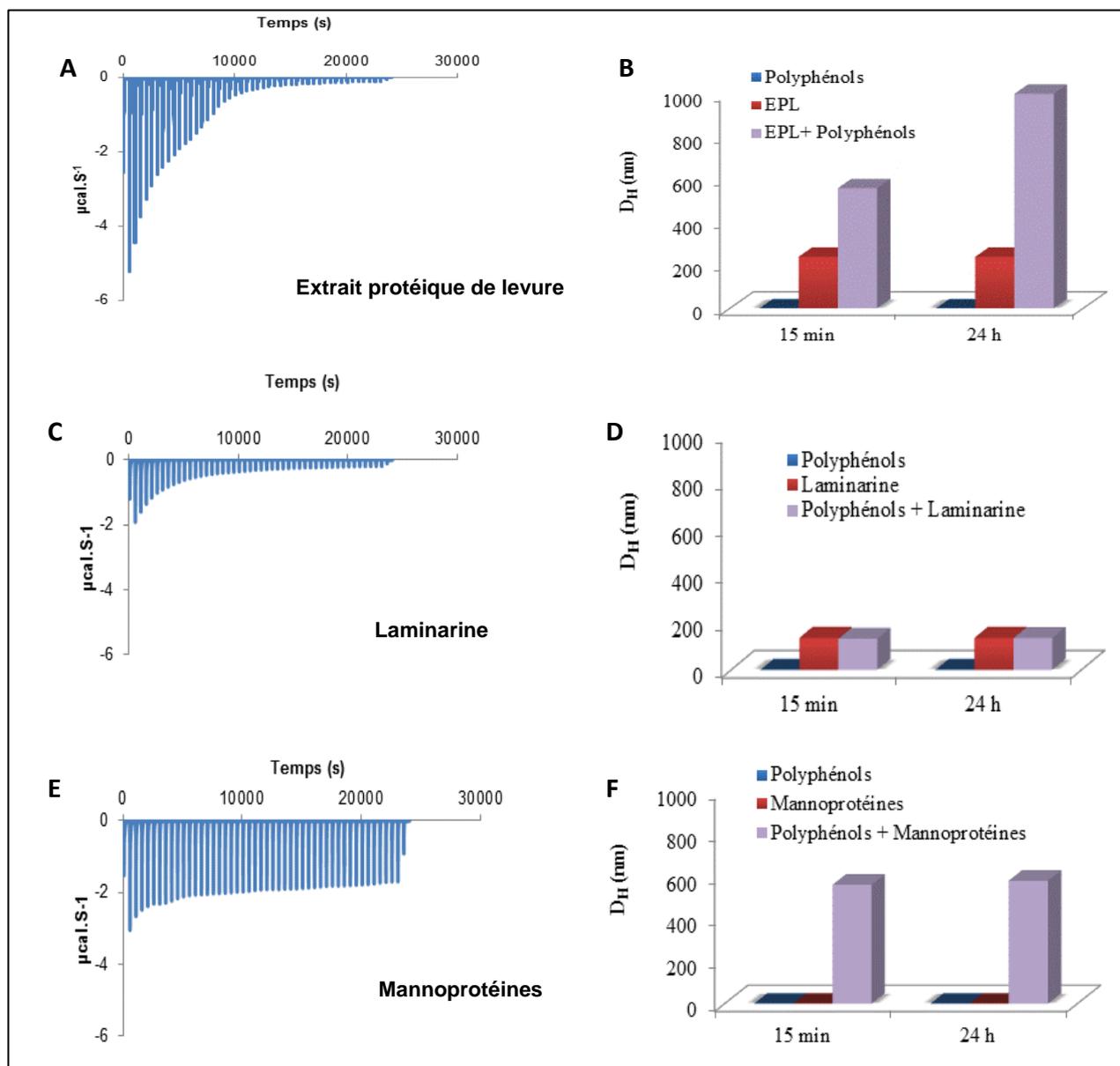


Figure 2. Résultats de l'ITC réalisé entre les tanins de pellicule de raisin (TP27) et (A) Extrait protéique de levure (EPL), (C) Laminarine (β -glucane) et (E) Mannoprotéines. Résultats de la DLS réalisée entre les tanins de pellicule de raisin (TP27) et (B) Extrait protéique de levure (EPL), (D) Laminarine (β -glucane) et (F) Mannoprotéines.

Le rôle essentiel de la composition en protéines levuriennes de l'EPL vis-à-vis des polyphénols du raisin a ainsi été établi. De par son fort potentiel d'agrégation et de précipitation des tanins, l'EPL représente ainsi une alternative fiable et novatrice aux agents de collage jusqu'ici utilisés en œnologie, tout en respectant les nouvelles attentes des consommateurs en termes de sécurité alimentaire et d'intrants naturels. Ces travaux ont également conforté l'hypothèse selon laquelle les mannoprotéines libérées par les levures inactivées spécifiques peuvent contribuer à l'amélioration de la qualité gustative des vins rouges à travers la formation des complexes stables en solution avec les tanins. Il est par ailleurs attendu qu'une application en tout début de vinification des fractions enrichies en mannoprotéines

pourrait conduire à limiter précocement l'agrégation des tanins et des anthocyanes, contribuant ainsi à la couleur et à la texture des vins rouges.

Conclusion

Ces travaux de recherche qui se poursuivent permettent de progresser dans la compréhension des mécanismes d'interaction entre dérivés de levure et polyphénols dans le contexte de la vinification en rouge, d'identifier les fractions potentiellement intéressantes et d'expliquer les effets empiriquement observés. Les levures ont donc un potentiel infini, au cœur des fermentations alcooliques, elles sont aussi un réservoir immense de composés d'intérêt œnologique, pour l'amélioration de la qualité des vins.

Références

- (1) A. Lonvaud-Funel, C. Desens, A. Joyeux. Stimulation de la fermentation malolactique par addition au vin d'enveloppes de levures et de différents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Connaissance Vigne Vin*, 1985, 19, N° 4, 229-240.
- (2) S. Lafon-Lafourcade, C. Geneix, P. Ribéreau-Gayon. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, 47, N° 6, 1246-1249.
- (3) J. Mekoue Nguela, N. Sieczkowski, S. Roi. Vernhet, A. Sorption of Grape Proanthocyanidins and Wine Polyphenols by Yeasts, Inactivated Yeasts, and Yeast Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 660–670.
- (4) J. Mekoue Nguela, A. Vernhet, N. Sieczkowski, J. M. Brillouet. Interactions of Condensed Tannins with *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast Cells and Cell Walls: Tannin Location by Microscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 7539–7545.
- (5) J. Mekoue Nguela, C. Poncet-Legrand, N. Sieczkowski, A. Vernhet. Interactions of grape tannins and wine polyphenols with a yeast protein extract, mannoproteins and β -glucan. *Food Chemistry*, 2016, 210, 671–682.

Les laccases de *Botrytis cinerea* : Structures, activités, effet souche et inhibitions par des extraits polyphénoliques

Cédric Saucier¹, Natalia Quijada Morín¹, François Garcia¹, François-Xavier Sauvage, Karen Lambert², Anne-Sophie Walker³, Muriel Viaud³, Laurent Tiers⁴, Christophe Hirtz⁴ Nerea Iturmendi⁵ & Virginie Moine⁵

(1) UMR SPO, Université Montpellier, INRA, Montpellier Supagro, France

(2) PHYMEDEXP, INSERM U1046, CNRS, UMR 9214 Université de Montpellier, France

(3) UMR 1290 BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, France

(4) LBPC-IRMB, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier, France

(5) Biolaffort, 126 quai de la Souys, Bordeaux, France

Introduction

Botrytis cinerea est responsable d'une des infections les plus importantes des raisins à maturité particulièrement dans les vignobles exposés aux conditions climatiques fraîches et pluvieuses. Il cause d'importantes baisses de qualité même à un taux de contamination estimée à 5% (Ky *et al.*, 2012). La couleur et les qualités organoleptiques des vins sont particulièrement affectées. La laccase provenant de *Botrytis cinerea* est étudiée depuis les années 1970 pour son activité dans le raisin et le vin mais aussi pour son activité oxydante vis à vis de différents substrats. On trouve dans la littérature scientifique plusieurs publications qui décrivent les principales caractéristiques de la laccase comme par exemple son poids moléculaire, son pourcentage de glycosylation, son point isoélectrique ou son activité en fonction du pH ou de la température. Néanmoins, il subsiste d'importantes variations de ces paramètres. Le récent séquençage du génome de *Botrytis* a mis en évidence la présence de plusieurs gènes pouvant coder des laccases (Amselem *et al.*, 2011).

L'objectif de nos travaux de recherches a été de caractériser les structures et les activités laccase de 3 souches de *Botrytis cinerea* (B0510, VA612 and RM344) par des techniques modernes: spectrométrie de masse, séquençage des gènes, % de glycosylation, mesure des activités enzymatiques et mesure de l'influence de paramètres environnementaux (température, pH).

Résultats et Discussion

3 souches de *Botrytis*, une de référence (B0510) et deux souches isolées dans deux vignobles (VA612 et RM344) ont été cultivées au laboratoire dans des conditions identiques. Les analyses protéomiques sur gel SDS-PAGE des laccases isolées des cultures sont représentées **Figure 1**. Le poids moléculaire apparent des laccases est identique, de l'ordre de 94 kDa pour toutes les souches. De même le taux de glycosylation apparent après déglycosylation des laccases, est estimé à 68% pour toutes les souches. Toutefois, le taux d'activité des différentes souches et la gamme d'activité en fonction du pH sont différents pour les souches (**Figure 2**). Si toutes les souches sont actives au pH du moût de raisin et du vin (entre 3 et 4), on note une activité plus importante pour la souche VA 612 et une gamme d'activité plus large (entre 3 et 7) comparés aux autres souches. De même la stabilité des laccases vis à vis de la chaleur est très différente selon la souche (**Figure 3**) : Les laccases produites par VA 612 sont nettement plus stables à la chaleur et ne sont inhibées qu'à partir de 60°C contrairement aux deux autres souches qui sont plus thermosensibles. Des analyses complètes au niveau moléculaire ont révélé que 2 protéines de types laccase sont produites par les 3 souches: les Laccase 3-BcLCC7 et Laccase 2-BcLcc2 ont été identifiées de manière formelle par spectrométrie de masse pour les 3 souches. Le séquençage des

gènes codant pour ces laccases pour les 3 souches n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives pouvant expliquer les différences d'activité (Quijada-Morin *et al.*, 2017). De même la caractérisation des sites actifs par électrochimie n'a pas permis de détecter de différences significatives de profils qui étaient tous semblables à ceux de la **figure 4**.

Afin d'inhiber ces laccases en œnologie, les stratégies classiques sont l'utilisation de SO₂ ou du traitement à la chaleur. Afin de limiter les doses de SO₂ et d'énergie, d'autres possibilités existent telles que l'utilisation d'extraits polyphénoliques au niveau du moût pour la vinification en rouge. Un exemple de l'inhibition des laccases par un extrait polyphénolique de noix de galle est présenté Figure 5 et montre des résultats intéressants. Des recherches sont en cours pour développer des extraits polyphénoliques spécifiques de cette inhibition.

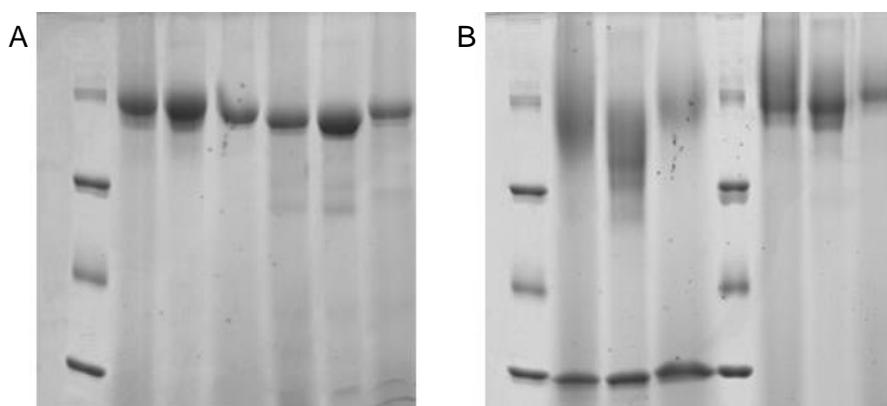


Figure 1. Analyse des laccases des 3 souches sans (A) ou avec (B) déglycosylation

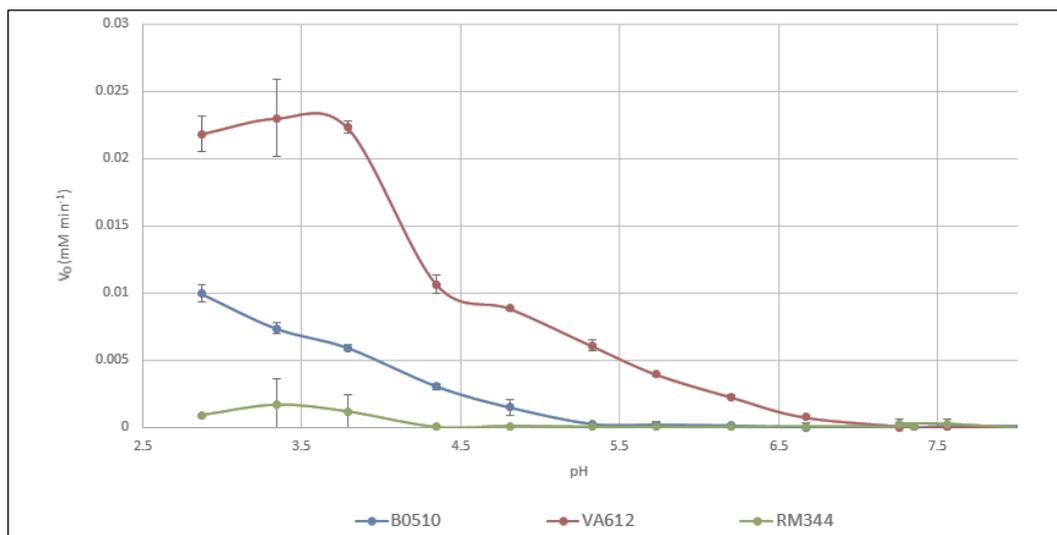


Figure 2. Activités des laccases des 3 souches en fonction du pH

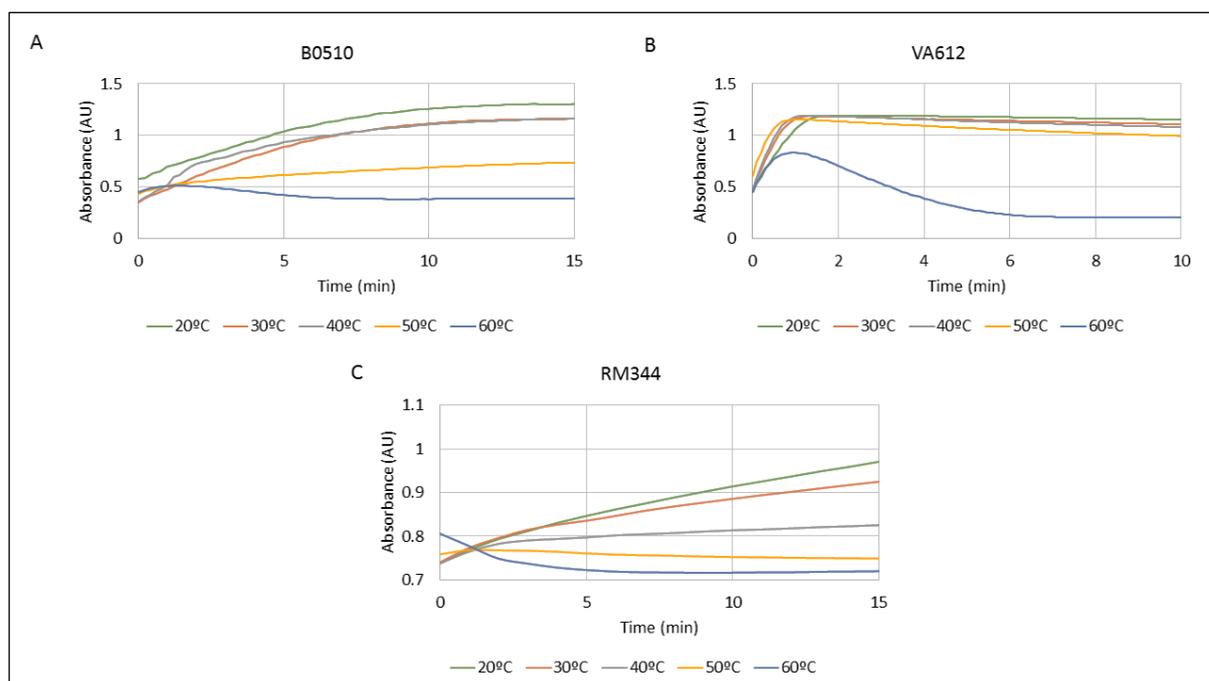


Figure 3. Effet de la température sur les activités laccases des 3 souches

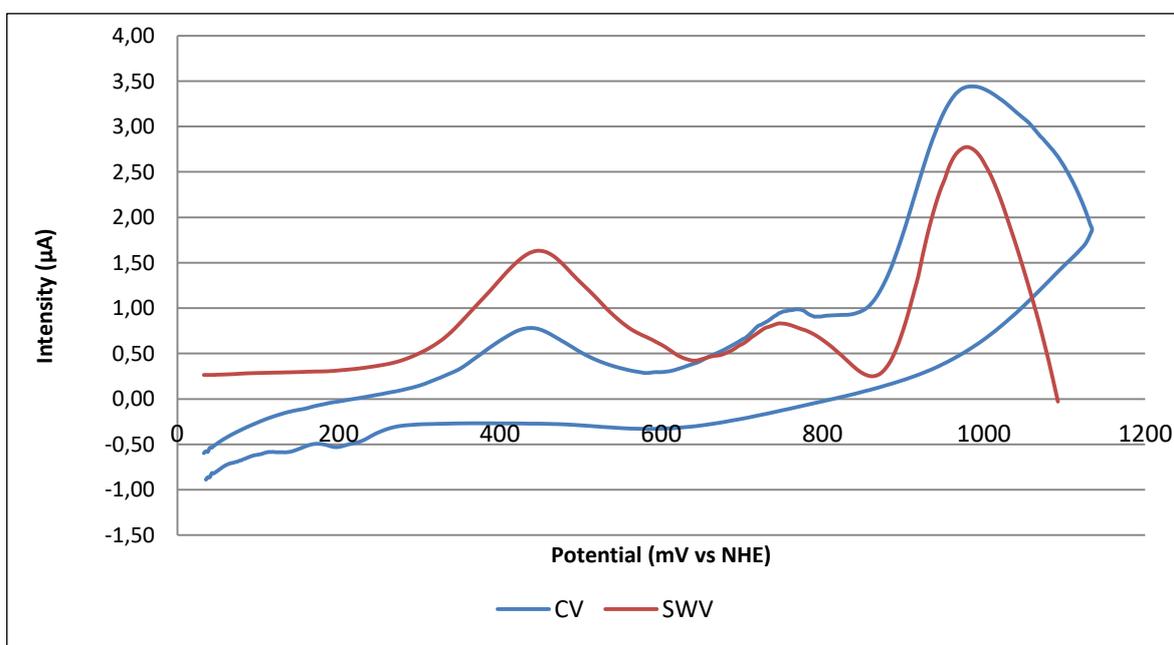


Figure 4. Profil électrochimique des laccases (CV, Cyclic Voltammetry ; SWV, Square Wave Voltammetry)

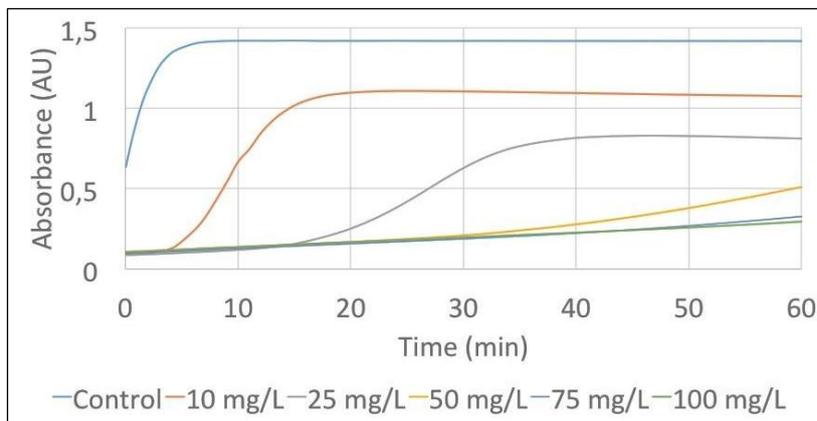


Figure 5. Inhibition des laccases par un extrait phénolique de noix de galle

Conclusion

Les analyses par spectrométrie de masse ont révélé la présence de deux laccases à poids moléculaire et degré de glycosylation équivalents pour les 3 souches mais on note en revanche différentes propriétés catalytiques des enzymes produites. Les mesures d'activité montrent des différences importantes entre les souches. Leurs comportements en fonction du pH et de la température sont également différents. Des mesures de potentiel redox et des activités vis-à-vis de différents composés phénoliques sont en revanche très proches selon les souches. Dans un deuxième temps, les interactions polyphénols-laccase ont été mesurées et on note des différences au niveau de l'inhibition. Les résultats de ces recherches apportent un éclairage nouveau à un phénomène bien connu des vinificateurs mais qui n'est pas systématiquement maîtrisable.

Références

- Amselem, J., et al. 2011 Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plos Genetics* 7, e1002230.
- Ky, I., Lorrain, B., Jourdes, M., Pasquier, G., Fermaud, M., Geny, L., Rey P., Donech B., Teissedre, P. L. 2012. Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18, 215-226.
- Mayer, A.M., Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551-565.
- Quijada-morin, N., Garcia, F., Lambert, K., Walker, A. S., Tiers, L., Viaud, M., Sauvage, F.X., Hirtz, C., Saucier, C. 2017. Strain effect on extracellular laccase activities from *botrytis cinerea*. *Austr. J.Grape Wine Res.* DOI: 10.1111/ajgw.12322
- Steel, C.C., Blackman, J.W., Schmidtke, L.M. 2013. Grapevine Bunch Rots: Impacts on Wine Composition, Quality, and Potential Procedures for the Removal of Wine Faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 5189-5206.

Risques associés à l'activité Polyphénol Oxydase (PPO) et vinification bas intrants

Yannick Sire, Elodie Remise, Alain Samson, Michel Moutounet, Jean-Michel Salmon

INRA Unité expérimentale de Pech Rouge (UE 0999), domaine de Pech Rouge, 11430 Gruissan, France

Introduction

Dans le contexte actuel de la réduction des sulfites et plus généralement des intrants en vinification, le comportement de l'activité polyphénol oxydase doit être pris en compte du raisin à la récolte, au cours des étapes d'élaboration des moûts jusqu'à la fin de fermentation. En effet, cette activité enzymatique oxydante peut apparaître sous deux formes, soit sous forme soluble, soit sous forme liée à des particules, qui ne vont pas réagir de façon identique au cours du processus d'élaboration du vin. Dans certaines conditions, le remplacement partiel des sulfites par un refroidissement de la vendange ou des moûts n'empêche pas une forte rémanence de cette activité, notamment sous sa forme soluble, même après la fin de fermentation alcoolique. Il est donc important de tenir compte spécifiquement de l'activité PPO soluble résiduelle, seule activité susceptible d'impacter significativement la conduite d'un itinéraire technologique (mené en bio ou non). En absence d'un effet suffisant des doses de sulfites ajoutés, seul un traitement thermique des moûts peut permettre une dénaturation totale de cette activité oxydante.

Mesure de l'activité Polyphénol oxydase (PPO)

L'activité PPO a été mesurée de façon normée après extraction standardisée du raisin dans un pressoir anoxique de laboratoire, sans étapes de trituration ni de rebêchage. Cette mesure doit être considérée comme le potentiel en activité PPO de l'échantillon analysé, ce qui peut permettre de déterminer l'influence de pratiques culturales ou d'itinéraires d'élaboration sur la variation de ce potentiel. La vitesse de consommation de l'oxygène dissout est mesurée à l'aide d'une pastille PreSens® PSt3 (Precision Sensing GmbH, Regensburg, Allemagne) dans un flacon bouché vis de 5 ml thermostaté et sous agitation. Ce flacon est rempli de 4 ml d'une solution tampon saturée à l'air (citrate/phosphate Na₂HPO₄-2H₂O 50 mM, pH 4,8) contenant 10 mM d'acide chlorogénique, substrat possédant une très forte affinité vis-à-vis de la PPO du raisin (Lee *et al.*, 1983). La réaction est déclenchée par addition de 400 µl d'échantillon (moût ou vin brut), et la mesure d'activité est effectuée en condition de vitesse initiale pendant 5 minutes, la PPO étant soumise à inactivation pendant son fonctionnement (Whitaker, 1995). L'activité PPO correspond à la quantité d'oxygène consommé à une température de 25°C en nanokatal (nKat = nmol O₂ L⁻¹ s⁻¹). La différenciation entre activités PPO solubles et particulaires est obtenue par la mesure de l'activité sur un même échantillon avant et après centrifugation (10 min, 12000 *xg*) (Interesse *et al.*, 1984).

Evolution de l'activité Polyphénol oxydase (PPO) au cours de la maturation du raisin

L'activité PPO est essentiellement localisée dans les chloroplastes, mais également dans la fraction soluble de la cellule (Dubernet, 1974). Dès la rupture cellulaire, elle est retrouvée à la périphérie des débris cellulaires de la pulpe (Christensen, 2000), avec une augmentation de ses formes solubles (Macheix *et al.*, 1991).

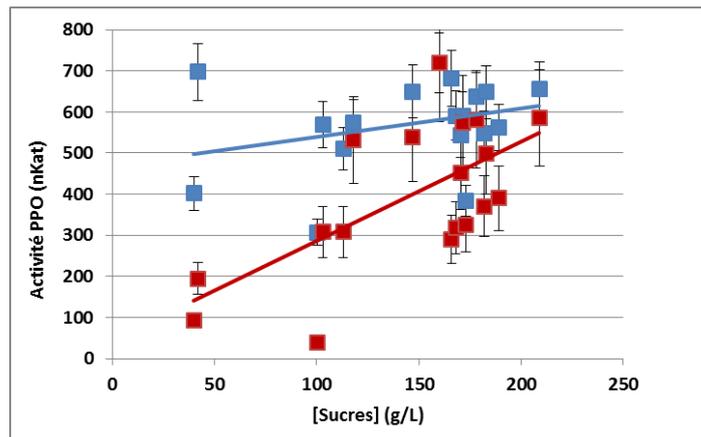


Figure 1. Evolution des activités polyphénol oxydase (PPO) totale (■) et soluble (■) au cours de la maturation du raisin. Mesures effectuées sur des prélèvements de microvignes cultivées en serre à température constante (20°C).

Concernant l'évolution de l'activité PPO au cours de la maturation du raisin, il a déjà été signalé un pic d'activité totale aux environs de la maturité technologique suivi d'une diminution ultérieure, sans toutefois différencier activités solubles et particulières (Wissemann et Lee, 1980 ; Sapis *et al.*, 1983a). Aucun travail antérieur n'ayant été publié sur l'évolution de cette activité avant la maturité technologique, nous avons suivi celle-ci sur des microvignes, matériel permettant aisément d'obtenir une même variété à divers niveaux de maturité sur un même plant (Chaib *et al.*, 2010). On observe sur microvignes un net remodelage de la localisation de la PPO (**Figure 1**). Au cours de la maturation, alors que l'activité de la PPO soluble augmente, l'activité de la PPO particulaire décroît, sans que l'activité totale ne semble affectée (**Figure 1**). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'il se produit au cours de la maturation un transfert de l'enzyme des fractions particulières (parties solides) vers la partie liquide soluble (Remise, 2016).

Variabilité de l'activité Polyphénol oxydase (PPO) en fonction des cépages et de facteurs culturaux

La variabilité de l'activité PPO décelable au moment de la récolte (à maturité technologique) a été étudiée pour différentes variétés, sur différentes parcelles et pour divers modes de conduite pour deux millésimes (**Tableau 1**). Même si cette étude n'est pas exhaustive, pour les 35 lots de raisin étudiés, l'activité PPO totale moyenne s'établit autour de 750 nKat, avec un écart-type de seulement 72 nKat (soit moins de 10% de la valeur moyenne). Cette valeur très centrée de l'activité PPO montre à l'évidence que les différences d'oxydabilité connues entre cépages blancs ne peuvent être attribuées à des variations de l'activité PPO. L'étude la plus similaire réalisée sur diverses variétés de raisins récoltés à maturité (Sapis *et al.*, 1983b) montrait après extraction totale de la PPO par précipitation à l'acétone une variabilité de l'activité PPO d'un facteur 1 à 3 suivant les cépages. On peut noter que la seule variété de raisin noir testée sur deux millésimes (Grenache noir) rentre aussi dans cette fourchette. La répartition entre activités solubles et particulières (**Tableau 1**) montre par contre une dispersion beaucoup plus forte, avec une répartition moyenne d'environ 50%, assortie d'un fort écart type (24%).

Tableau 1. Activités PPO de différentes variétés de raisin (vendanges 2013 et 2014) pressurées en conditions anoxiques. En dehors des conditions dénotées par un astérisque, les vignes sont conduites en espalier, non irriguées et les raisins récoltés à maturité technologique. * : FI: fertirrigué, I: irrigué, NI: non irrigué, E: partiellement effeuillé, NE: non effeuillé, Mx: niveau de maturité à la récolte, TM: taille minimale, ESP: espalier, TRP: taille rase de précision.

Variétés (date, origine)	Activité totale PPO (nkat)	Répartition	
		Soluble (%)	Particulaire (%)
Bourboulenc (08/10/2013, UEPR parcelle 68)	842	74,5%	25,5%
Bourboulenc (22/09/2014, UEPR parcelle 68)	739	79,2%	20,8%
Chardonnay (30/08/2013, UEPR parcelle 81)	821	84,2%	15,8%
Chardonnay (26/08/2014, UEPR parcelle 81)	726	43,8%	56,2%
Chardonnay-FI * (25/08/2014, UEPR parcelle 81)	759	65,7%	34,3%
Chardonnay-I * (25/08/2014, UEPR parcelle 81)	701	87,0%	13,0%
Chardonnay-NI * (25/08/2014, UEPR parcelle 81)	746	59,1%	40,9%
Grenache blanc (17/09/2013, UEPR parcelle 75)	834	10,7%	89,3%
Grenache gris (17/09/2013, UEPR parcelle 71)	693	10,8%	89,2%
Grenache noir (18/09/2013, UEPR parcelle 64)	799	26,3%	73,7%
Grenache noir (19/08/2014, UEPR parcelle 64)	574	20,9%	79,1%
Maccabeu (17/09/2013, UEPR parcelle 66)	803	80,3%	19,7%
Mauzac-E-M1* (23/09/2014, Limoux parcelle A)	761	45,2%	54,8%
Mauzac-E-M2* (02/10/2014, Limoux parcelle A)	732	28,8%	71,2%
Mauzac-NE-M1* (23/09/2014, Limoux parcelle A)	657	37,6%	62,4%
Mauzac-NE-M2* (02/10/2014, Limoux parcelle A)	740	69,5%	30,5%
Muscat (25/09/2013, UEPR parcelle 98)	773	25,4%	74,6%
Muscat (25/09/2013, UEPR parcelle 91)	786	96,7%	3,3%
Muscat-M1* (01/09/2014, UEPR parcelle 51)	797	64,9%	35,1%
Muscat-M2* (10/09/2014, UEPR parcelle 51)	682	52,1%	47,9%
Piquepoul (12/09/2014, UEPR parcelle 8)	720	44,9%	55,1%
Roussanne (17/09/2013, UEPR parcelle 68)	866	64,5%	35,5%
Sauvignon (09/09/2013, UEPR parcelle 10)	795	31,6%	68,4%
Syrah (19/09/2013, UEPR parcelle 22)	802	74,3%	25,7%
Vermentino (25/09/2013, UEPR parcelle 67)	807	45,0%	55,0%
Vermentino (25/09/2013, UEPR parcelle 68)	793	30,5%	69,5%
Vermentino-M1* (14/08/2014, UEPR parcelle 68)	752	49,6%	50,4%
Vermentino-M2* (20/08/2014, UEPR parcelle 68)	646	33,0%	67,0%
Vermentino-M3* (28/08/2014, UEPR parcelle 68)	711	28,7%	71,3%
Vermentino-M4* (04/09/2014, UEPR parcelle 68)	777	52,3%	47,7%
Vermentino-M5* (15/09/2014, UEPR parcelle 68)	532	0,0%	100,0%
Viognier-TM (24/09/2013, UEPR parcelle 55)	820	73,0%	27,0%
Viognier-TM (08/09/2014, UEPR parcelle 55)	754	76,1%	23,9%
Viognier-ESP (20/08/2014, UEPR parcelle 55)	658	44,5%	55,5%
Viognier-TRP (28/08/2014, UEPR parcelle 55)	756	67,6%	32,4%
Moyenne	747	50,8%	49,2%
(écart-type)	(72)	(24,3%)	(24,3%)

Le degré de maturité à la récolte impacte aussi fortement la proportion d'activité PPO soluble résiduelle. Ces nouveaux résultats posent la question de l'efficacité du débouillage pour la réduction de l'activité PPO particulaire suivant la récolte, paramètre non pris en compte jusqu'à maintenant dans la réflexion du traitement de la vendange à la récolte, à réception et pour son traitement pré-fermentaire.

Influence de la température sur l'activité Polyphénol oxydase (PPO) du raisin

Des travaux menés sur le refroidissement de la vendange ont permis de montrer que l'effet positif du refroidissement de la vendange était dominant sur l'effet négatif d'une plus forte solubilité de l'oxygène dans le moût (Frissant *et al.*, 2012). En effet, un abaissement de la température moyenne de la vendange de 20°C à 5-7°C réduit la vitesse de la réaction enzymatique et amenuise donc l'intensité des phénomènes oxydatifs, en réduisant d'environ 50% (de 7 à 3 mg/L) la quantité totale d'oxygène consommé estimée depuis la récolte jusqu'à l'obtention du moût. Ce résultat (mesuré sur des moûts obtenus en situation industrielle) est ici confirmé puisque une réduction de température similaire entraîne une diminution de 50% de l'activité PPO (**Figure 2**). Il est à noter que, même à 0°C, environ 30%

de l'activité PPO initiale reste détectable, donc active. L'inactivation de l'activité PPO n'est obtenue que pour des températures aux alentours de 80-85°C (**Figure 3**), régimes de température susceptibles de participer à la dégradation des anthocyanes du raisin (Iyengar et Mc Evily, 1992). L'inactivation thermique à 70°C (valeur maximale autorisée en l'état actuel de la réglementation sur la vinification biologique) a été également testée: dans ces conditions, dès 2 minutes de traitement, l'activité PPO baisse d'un facteur 8, mais seul un traitement de 8 minutes à 70°C permet de ne plus déceler d'activité PPO (Sire *et al.*, 2016).

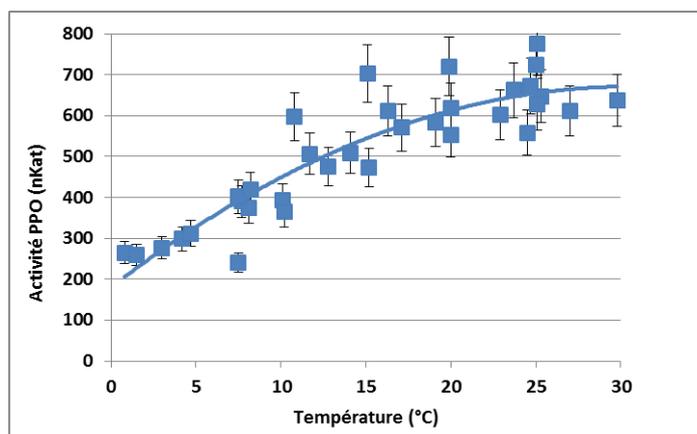


Figure 2. Variation de l'activité polyphénol-oxydase du raisin (Cépage Colombar, vendange 2014) en fonction de la température de mesure de cette activité.

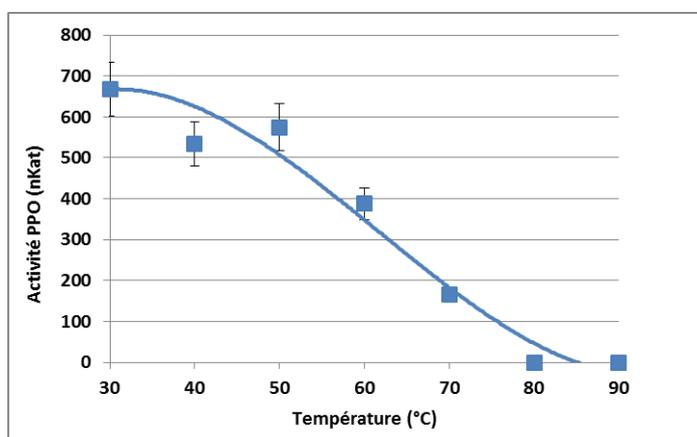


Figure 3. Effet de la température de mesure sur l'activité PPO du raisin (Cépage Chardonnay, vendange 2012).

Influence du SO₂ sur l'activité Polyphénol oxydase (PPO) du raisin

L'étude de l'influence de la teneur en sulfites ajoutés sur l'activité PPO montre que le maximum d'inhibition n'est pas obtenu instantanément, mais qu'il faut un temps de contact d'au moins 30 min pour constater un effet. On remarque également que l'inhibition totale par les sulfites n'est obtenue que pour des teneurs supérieures à 40 mg L⁻¹, un ajout de 20 mg L⁻¹ de sulfites n'inhibant que 50% de l'activité PPO initiale (Sire *et al.*, 2016).

Influence des itinéraires technologiques sur l'activité Polyphénol oxydase (PPO) du raisin

L'effet du refroidissement de la vendange à la machine à vendanger ou au cours du pressurage et celui d'ajouts de sulfites à différentes étapes entre la récolte et le jus extrait, sur l'évolution de l'activité PPO a été testé (**Tableau 2**). Il est remarquable de constater qu'un refroidissement de la vendange dès la récolte et son maintien à basse température (2-3°C) pendant le pressurage, opération préconisée pour limiter les phénomènes d'oxydation en absence de sulfites ajoutés, maintient l'activité PPO à un niveau très élevé, y compris après la fin de la fermentation alcoolique (Modalité A : 185 nKat, soit environ 30% de l'activité initiale). Dans ces conditions, un débourbage statique à 10°C ne permet pas de réduire l'activité PPO particulière du moût. L'addition de sulfites à la machine à vendanger permet d'inhiber fortement l'activité PPO dans le jus d'égouttage, sans toutefois protéger les jus de presse qui doivent être alors protégés spécifiquement à chaque séquence de pressurage. Même si le jus d'assemblage ne présente plus d'activité PPO mesurable, les bourbes issues du débourbage montrent une activité PPO résiduelle. Il est intéressant de noter que seules les modalités B et C avec addition préalable de sulfites présentent une activité PPO nulle au stade vin, ce qui n'est pas le cas pour la modalité A n'ayant pas reçu de sulfites. Ceci pose le problème de l'élaboration de vins sans sulfites pour lesquels il est indispensable de trouver une solution de substitution au risque de favoriser une oxydation dépréciant la qualité des vins.

Tableau 2. Activité PPO (mesurée à 25°C) de moûts de Chardonnay (vendanges 2014) au cours du pressurage sur presseur pneumatique suivant diverses modalités. (A) refroidissement préalable de la vendange à la machine à vendanger (2-3 °C), pressurage avec refroidissement de chaque pressée (2-3°C) sans ajout de sulfites, (B) ajout de métabisulfite à la machine à vendanger (30 g pour 700 Kg, 19-20°C), pressurage avec ajout de sulfites à chaque pressée (3 g par hL de jus écoulé), (C) ajout de métabisulfite à la machine à vendanger, vendange refroidie au quai de réception (13°C), et pressurage avec refroidissement de chaque pressée (13°C) sans ajout de sulfites.

Echantillons	Modalités		
	A	B	C
	Activité totale PPO (nKat)		
Raisin pressé en conditions anoxiques (activité soluble, activité particulière)	726 (320, 406)		
Jus d'égouttage	575	nd	128
Premières presses	679	567	378
Dernières presses	712	661	418
Moût moyen (assemblage jus d'égouttage et presses)	674	0	315
Moût après débourbage (Bourbes)	427 (739)	0 (317)	127 (913)
Vin en fin de fermentation	185	0	0

Dans le cas où la proportion de PPO soluble est élevée dans le moût après pressurage (cépage présentant à maturité une forte proportion d'activité PPO soluble, itinéraire de pressurage protégé par le refroidissement, pas ou peu de sulfites ajoutés), donc non éliminée par le débourbage, une étape de pasteurisation du moût apparaît alors efficace pour supprimer toute activité PPO du moût lors de sa mise en fermentation (Sire *et al.*, 2016).

Conclusion

La réduction de l'usage des sulfites en vinification demande un réexamen approfondi de l'occurrence de l'activité PPO lors de l'élaboration des vins afin de définir les meilleures stratégies pour s'en prémunir. Il est tout d'abord important de connaître la répartition relative entre activités PPO soluble et particulaire du raisin lors de sa récolte, puisque les opérations de débouillage n'ont qu'une action préférentielle sur l'activité particulaire. Des raisins riches en forme soluble de l'activité PPO peuvent conduire à un moût présentant une forte activité PPO en début de fermentation, activité qui peut se maintenir même après la fermentation alcoolique. Cette situation n'avait jamais été décrite auparavant dans la littérature et était même généralement admise comme impossible dans la communauté œnologique. Il apparaît toutefois que la diminution de l'usage des sulfites dans les étapes précédant la fermentation alcoolique, et leur remplacement par un abaissement de la température lors des opérations de récolte et de pressurage peuvent conduire à une telle situation. De telles pratiques sont pourtant de plus en plus fréquentes dans le cadre de vinifications à basses quantités d'intrants.

Dans de telles conditions, seule l'inactivation thermique de l'activité PPO par une pasteurisation du moût reste le moyen le plus efficace pour annihiler toute activité PPO résiduelle avant mise en fermentation, de façon à obtenir un réel gain qualitatif sur le vin final.

Références

- Chaïb J., Torregrosa L., Mackenzie D., Corena P., Bouquet A., Thomas M. R. 2010 –The grape microvine – a model system for rapid forward and reverse genetics of grapevines. *The Plant Journal*, 62, 1083-1092.
- Christensen L.P., 2000 – Raisin production manual. Publication 3393. Agricultural & Natural Resources, communication services. Ed. University of California, Oakland, USA (45 p.).
- Dubernet M. 1974 – Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications technologiques. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux II.
- Frissant S., Delmas C., Souquet J.M., Samson A., Salmon J.M. 2012 – Management de la température de la vendange depuis la vigne jusqu'à la mise en fermentation: étude quantitative de la protection obtenue contre l'oxydation. *Revue des Œnologues*, 145 spécial, 21-25.
- Interesse F.S., Alloggio V., Lamparelli F., D'Avella, G. 1984 – Characterization of the oxidative enzymatic system of the phenolic compounds from Muscat grapes. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 5-10.
- Iyengar R., Mc Evily A. J. 1992 – Anti-browning alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 3, 60-64.
- Lee C.Y., Smith N.L., Pennesi A.P. 1983 – Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34, 987-991.
- Macheix J.J., Sapis J.C., Fleuriet A. 1991 – Phenolic compounds and polyphenoloxidases in relation to browning in grapes and wines. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 30, 441-486.
- Remise E. 2016 – Suivi de l'activité enzymatique polyphénol oxydase et des quantités de substrat correspondant en fonction des stades phénologiques du raisin. Rapport de stage de Licence 3 Chimie Prépa DNO, Université de Montpellier.
- Sapis J.C., Macheix J.J., Cordonnier R.E. 1983a – The browning capacity of grapes. I. Changes in polyphenoloxidase activities during development and maturation of the fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 31, 342-345.
- Sapis J.C., Macheix J.J., Cordonnier R.E. 1983b – The browning capacity of grapes. II. Browning potential and polyphenoloxidase activities in different mature grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 34, 157-162.
- Sire Y., Douçot S., Pull M-J., Samson A., Moutounet M., Salmon J-M. 2016 – Activité polyphénol-oxydase du raisin : influence de la température et de différentes opérations. *Revue des Œnologues*, 160, Juillet 2016, 38-40.
- Whitaker, J.R. 1995 – Polyphenol oxidase. In *Food Enzymes Structure and Mechanism*, (D.W.S. Wong, ed.) pp. 271-307, Chapman and Hall, New York.
- Wissemann K.W., Lee C.Y. 1981 – Characterization of polyphenoloxidase from Ravat 51 and Niagara Grapes. *Journal of Food Science*, 46, 506-508.

L'UMT Minicave : outil de multi-vinifications en petit volume

Marie-Agnès Ducasse¹, Evelyne Aguera²

1-Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Rhône-Méditerranée, Domaine de Pech Rouge - 11430 Gruissan

2-INRA, Unité expérimentale de Pech Rouge - 11430 Gruissan

1. Contexte

La vinification est une étape clef dans de nombreuses expérimentations viticoles et œnologiques et sa mise en œuvre maîtrisée apparaît incontournable pour évaluer la qualité et les caractéristiques des vins. Actuellement, l'évaluation de l'impact des différents facteurs viti-vinicoles est réalisée lors de vinifications en volumes autour de 100 L, conduites pour être représentatives de vinifications à l'échelle industrielle. Toutefois, cette échelle expérimentale nécessite une disponibilité suffisante de la matière première et une main d'œuvre importante. Si des dispositifs de vinification à l'échelle laboratoire et en 100 L en phase liquide sont déjà disponibles à l'UMR SPO et à l'UE Pech Rouge (Casalta *et al.*, 2010), il s'avère pertinent de concevoir un dispositif permettant la conduite de vinifications de petits lots de vendange (<1 Kg) en phase hétérogène depuis les phases pré-fermentaires (foulage, macération, thermo-traitement) jusqu'à la fermentation et au pressurage. L'objectif principal de l'UMT Minicave est de concevoir un tel dispositif automatisé, dimensionné de manière adéquate, devant permettre :

- d'apporter de la robustesse aux expérimentations impliquant des vinifications, par la mise en œuvre systématique de triplicats.
- d'intégrer en amont les potentialités œnologiques dans la création variétale
- d'évaluer l'impact sur le vin d'un grand nombre de génotypes (panel de diversité ou descendants) soumis à différents stress (thermiques ou hydriques) et de tester des réponses œnologiques.
- de multiplier aisément les vinifications dans les essais de différents produits œnologiques en phase hétérogène, en conditions répétables et transposables à grande échelle (criblage de levures, d'enzymes et autres intrants).
- de mener également des études plus fondamentales sur des phénomènes encore mal connus en vinification en phase hétérogène comme les interactions entre levures et polyphénols ou l'extraction des composés d'intérêt.

En parallèle de la conception de l'outil automatisé, afin d'aborder les limites et les avantages de la micro-vinification en 1 kg et la mise en place de protocole d'échantillonnage approprié, une méthode de vinification a été testée en cafetière à piston (Dambergs *et al.*, 2010).

2. Matériels & Méthodes

La méthode de micro-vinifications en cafetière à piston adaptée de la méthode AWRI (Dambergs *et al.*, 2010) est récapitulée par le protocole de la **figure 1**. La robustesse d'une méthode se définit comme une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par de petites variations des conditions opératoires (Feinberg, 2001). Pour l'évaluer, deux tests de robustesse (plans d'expérience de type criblage) ont été réalisés sur Merlot et sur Cabernet Sauvignon.

Plusieurs facteurs ont été testés :

-Plan sur Merlot : opérateur à l'encuvage, poids en raisin (700 g / 900 g), jour de décuvage fin fermentation alcoolique (+2jours).

-Plan sur Cabernet Sauvignon : hauteur du piston (+1cm), perte de jus au foulage (-30mL), opérateur au pressurage.

La robustesse du protocole a été évaluée sur les paramètres œnologiques classiques (pH, acidité totale, alcool, acide malique) mais également sur les paramètres qualitatifs tels que les polyphénols (indice des polyphénols totaux, anthocyanes), la couleur (intensité colorante, les absorbances à 420, 520, 620 nm, les coordonnées tristimulaires $L^*a^*b^*$), et les principaux arômes du fruité (thiol : 3-mercaptophexan-1-ol, esters éthyliques : 2-phényléthanol, acétate d'isoamyle, acétate de 2-phényléthyle, décanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, octanoate d'éthyle, butanoate d'éthyle, 2-hydroxypropanoate d'éthyle, 2-méthylbutanoate d'éthyle, 2-méthylpropanoate d'éthyle, C13-norisoprénoides : β -damascénone, β -ionone, terpénols : linalol, nérol, géraniol, citronellol, α -terpineol, diméthylsulfure).

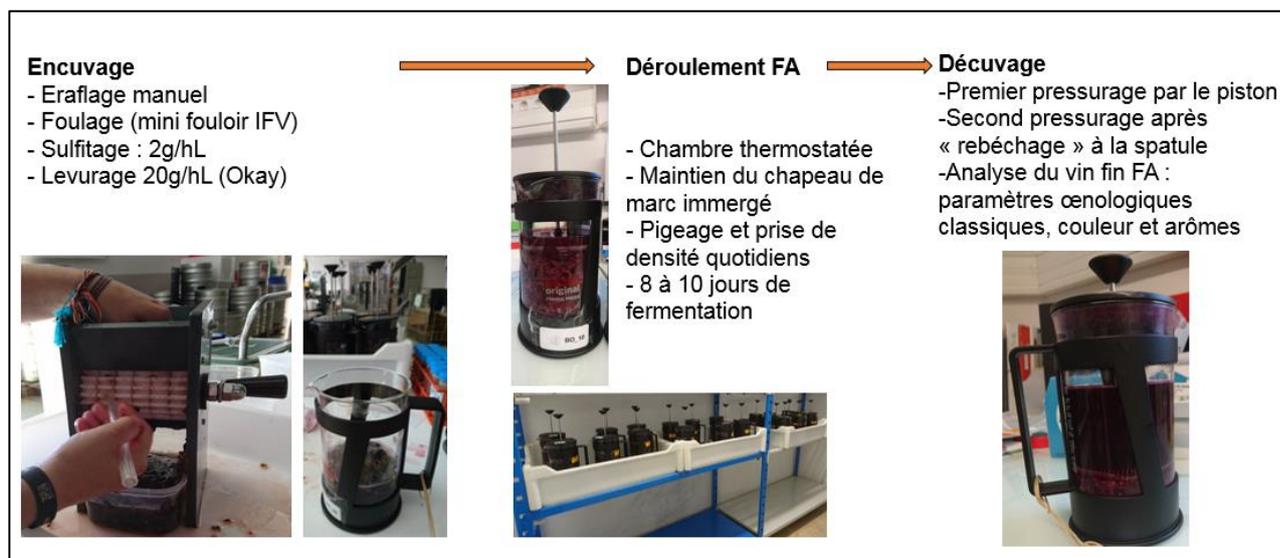


Figure 1. Protocole de micro-vinifications en cafetières à piston

3. Résultats et discussion

Les résultats du plan d'expérience sur Merlot sont présentés dans **Tableaux 1 et 2**. De façon à estimer quantitativement la fidélité (écart-type) de la méthode, une expérimentation du plan de criblage est répétée 6 fois. L'équation est d'ordre 1 : $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3$ et la comparaison des valeurs des coefficients a_1 , a_2 et a_3 avec l'écart type de fidélité (s) pour chaque grandeur mesurée (paramètres œnologiques, polyphénols totaux, anthocyanes et principaux arômes) a permis de déterminer si le facteur X_n est influent (si $|a^n| > 2s$). Sur ce premier plan d'expérience, les coefficients $|a_1|$, $|a_2|$, $|a_3|$ sont inférieurs à $2s$ sur les paramètres œnologiques et les indices d'extraction que sont l'indice des polyphénols totaux et les anthocyanes (tableau 1). Par conséquent, aucun des facteurs (jour du décuvage, poids de raisin, opérateur à l'encuvage) n'est influent sur les paramètres œnologiques et sur ces indices d'extraction. Sur les principaux arômes du fruité (tableau 2), les coefficients sont également inférieurs à $2s$, excepté pour la facteur a_1 dans le cas de l'acétate de 2-phényléthyle et de la β -damascénone. Ceci montre que les facteurs : poids de raisin, opérateur à l'encuvage, ne sont pas influents sur les principaux arômes du fruité mais que le facteur: jour de décuvage (+2j) peut légèrement influencer sur certains arômes. Ce facteur est à fixer dans le protocole.

Tableau 1. Résultats du plan d'expérience sur Merlot sur les paramètres œnologiques (pH, acidité totale, alcool, acide malique) et les indices d'extraction (indice des polyphénols totaux, anthocyanes).

paramètres	a0	s	2 s	a1	a2	a3	cv (%)
pH	3,14	0,02	0,04	0,00	0,02	0,00	0,6%
Acidité totale (g/L H ₂ SO ₄)	5,89	0,09	0,18	0,15	0,07	0,05	1,5%
Alcool (% vol)	14,03	0,05	0,11	0,07	0,02	0,07	0,4%
Acide malique (g/L)	1,15	0,03	0,07	0,02	0,03	0,00	3,0%
Indice Polyphénols Totaux	52,25	1,38	2,76	0,75	0,75	0,25	2,6%
Anthocyanes (mg/L)	720,75	26,56	53,12	9,25	6,25	0,25	3,7%

Tableau 2. Résultats du plan d'expérience sur Merlot sur les principaux arômes du fruité.

Arômes* (µg/L)	Descripteurs organoleptiques*	Seuil de perception*	LOQ*	a0	s	2 s	a1	a2	a3	cv (%)
2-phényléthanol	rose litchi	10000	5,56	76771	4270	8540	1027	2559	1641	6%
acétate d'isoamyle	banane	30	52,14	766	90	180	146	38	59	12%
acétate de 2-phényléthyle	rose fanée	250	1,28	85	6	12	26	7	3	7%
décanoate d'éthyle	fruit, poire, eau de vie	510	0,00	78	7	13	0	1	4	8%
hexanoate d'éthyle	pomme, ananas, fruit mur	200	17,16	411	49	98	60	4	6	12%
octanoate d'éthyle	pêche, ananas, bonbon	200	5,33	331	28	55	25	24	2	8%
butanoate d'éthyle	ananas, fraise, fromage, beurre	20	25,67	204	20	40	11	3	8	10%
2-hydroxypropanoate d'éthyle	fruité lacté, arôme très léger	154000	151	2208	85	169	82	167	14	4%
2-méthylbutanoate d'éthyle	kiwi, fraise chimique, aigre	18	2,20	7,13	0,64	1,27	0,05	0,02	0,24	9%
2-méthylpropanoate d'éthyle	fraise, kiwi, mûre	15	3,08	41,78	4,20	8,40	0,26	0,46	0,48	10%
β-damascénone	floral, coing, compote de pomme	0,05	0,00	3,65	0,11	0,22	0,60	0,01	0,09	3%
Linalol	floral, litchi, légèrement citronné	15	0,01	5,98	0,43	0,85	0,39	0,02	0,06	7%
Nérol	tilleul, rose	400	0,02	1,62	0,08	0,16	0,07	0,04	0,04	5%
Géranol	géranium, rose, bonbon	20	0,45	3,46	0,39	0,78	0,31	0,19	0,13	11%
Citronellol	citronnelle	100	1,50	8,14	1,00	1,99	0,17	0,01	0,44	12%
α terpineol	muguet	400	0,03	2,28	0,10	0,20	0,12	0,01	0,14	4%
Diméthylsulfure	truffe, choux, asperge	10	0,09	2,41	0,31	0,62	0,37	0,26	0,44	13%

*données arômes laboratoire Nyseos, LOQ = limite de quantification, CV = coefficient de variation.

Les résultats du plan d'expérience sur Cabernet Sauvignon sont présentés dans les **tableaux 3 et 4**. Sur ce second plan d'expérience, les coefficients $|a1|$, $|a2|$, $|a3|$ sont inférieurs à 2s sur les paramètres œnologiques, les indices d'extraction (indice des polyphénols totaux, anthocyanes), la couleur (tableau 3) et également sur les principaux arômes (tableau 4). Par conséquent, aucun des facteurs (hauteur du piston, perte de jus, opérateur au pressurage) n'est influent sur les paramètres œnologiques mais aussi sur des paramètres qualitatifs tels que la couleur et les principaux arômes du fruité.

Tableau 3. Résultats du plan d'expérience sur Cabernet Sauvignon sur les paramètres œnologiques (pH, acidité totale, alcool, acide malique), les indices d'extraction (indice des polyphénols totaux, anthocyanes) et la couleur (intensité colorante, absorbances à 420, 520, 620nm, coordonnées L*,a*,b*).

paramètres	a0	s	2s	a1	a2	a3	cv (%)
pH	3,63	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,3
Acidité totale (g/L H ₂ SO ₄)	5,60	0,11	0,21	0,01	0,11	0,05	1,9
Alcool (% vol)	13,24	0,14	0,29	0,03	0,07	0,10	1,1
Acide malique (g/L)	3,59	0,04	0,09	0,05	0,08	0,06	1,2
Indice Polyphénols Totaux	57,06	1,83	3,66	1,31	0,98	2,39	3,2
Anthocyanes (mg/L)	800,36	23,71	47,42	29,06	6,64	6,82	3,0
Intensité Colorante	16,72	0,71	1,43	0,29	0,20	0,11	4,3
DO420	5,10	0,15	0,30	0,03	0,08	0,05	2,9
DO520	10,02	0,55	1,11	0,30	0,09	0,03	5,5
DO620	1,60	0,04	0,08	0,02	0,03	0,03	2,6
L*	10,33	0,48	0,96	0,08	0,38	0,38	4,7
a*	38,92	0,61	1,22	0,02	0,47	0,51	1,6
b*	17,77	0,80	1,59	0,14	0,61	0,67	4,5

Tableau 4. Résultats du plan d'expérience sur Cabernet Sauvignon sur les principaux arômes du fruité.

Arômes* (µg/L)	Descripteurs organoleptiques*	seuil de perception*	LOQ*	a0	s	2s	a1	a2	a3	cv (%)
3-mercaptophexan-1-ol	pamplemousse	0,06	0,002	0,175	0,009	0,018	0,016	0,007	0,009	5
2-phényléthanol	rose litchi	10000	18,50	83085	5699	11398	4292	944	4389	7
acétate d'isoamyle	banane	30	174	695	92	184	6	43	128	13
acétate de 2-phényléthyle	rose fanée	250	4,28	105	9	18	14	13	15	9
décanoate d'éthyle	fruit, poire, eau de vie	510	0,00	84	5	10	3	2	7	6
hexanoate d'éthyle	pomme, ananas, fruit mur	200	57,20	591	62	124	14	27	38	10
octanoate d'éthyle	pêche, ananas, bonbon	200	19,68	412	25	51	7	6	10	6
butanoate d'éthyle	ananas, fraise, fromage, beurre	20	85,57	258	39	79	5	2	24	15
2-hydroxypropanoate d'éthyle	fruité lacté, arôme très léger	154000	502	598	32	64	6	5	26	5
3-hydroxybutanoate d'éthyle	fraise	1800	0,00	601	25	49	26	25	9	4
2-méthylpropanoate d'éthyle	fraise, kiwi, mure	15	10,27	17,47	2,88	5,76	0,37	1,28	2,10	16
β-damascénone	floral, coing, compote de pomme	0,05	0,00	1,24	0,04	0,08	0,03	0,00	0,05	3
β-ionone	violette, framboise	0,09	0,02	0,14	0,01	0,02	0,004	0,01	0,01	6
Linalol	floral, litchi, légèrement citronné	15	0,06	3,02	0,14	0,29	0,17	0,04	0,06	5
Nérol	tilleul, rose	400	0,06	1,25	0,05	0,10	0,03	0,06	0,04	4
Géranol	géranium, rose, bonbon	20	1,49	3,27	0,10	0,20	0,19	0,10	0,06	3
Citronellol	citronnelle	100	5,02	12,07	0,29	0,58	0,00	0,42	0,42	2
α terpineol	muguet	400	0,09	1,00	0,03	0,07	0,06	0,00	0,00	3

*données arômes laboratoire Nyseos, LOQ = limite de quantification, CV = coefficient de variation.

Les coefficients de variation (CV%) des paramètres œnologiques et de la couleur sont faibles comme déjà démontrés dans la littérature (Dambergs et al. 2010, Sparrow et al., 2015). Il est remarquable de noter que les coefficients de variation sont également inférieurs à 10% sur la plupart des arômes dosés. Cette étude apporte des données supplémentaires sur la robustesse de la méthode de vinification en cafetières à piston sur les principaux marqueurs du fruité.

Conclusion

La méthode est robuste sur les paramètres œnologiques mais également sur les paramètres qualitatifs : couleur et principaux arômes du fruité. Des coefficients de variation bas sur la plupart des paramètres montrent la performance des micro-vinifications en cafetières à piston. Ceci est primordial pour l'expérimentation. Cette méthode peut être utilisée pour évaluer les limites et les avantages des micro-vinifications en petit volume.

Perspectives

Les attentes et les perspectives de l'utilisation de l'outil de micro-vinifications en rouge (<1kg) sont nombreuses. L'échantillonnage de ces 1kg de raisins est primordial pour pouvoir répondre à des essais viticoles (agronomiques) ou à des essais œnologiques (criblage de produits œnologiques). Des protocoles d'échantillonnage sont actuellement en cours d'évaluation. La comparaison d'échelle 1kg/100kg est également en cours pour justifier que l'échelle 1 kg peut être utilisée pour intégrer en amont des critères œnologiques à la sélection variétale. Le prototypage (analyse fonctionnelle et caractérisation des fonctions) de l'outil final automatisé pour des micro-vinifications en rouge mobilise à l'heure actuelle les équipes de Supagro, de l'INRA (UMR SPO, UE Pech Rouge) et de l'IFV.

Remerciements

L'UMT Minicave est financée par l'ACTIA. Nous remercions tous les acteurs de cette première année de lancement, en particulier l'équipe de l'IFV Pech Rouge (D. Caboulet, A.Roy, E.Romero, N. Imbern) ainsi que les stagiaires A. Garnier, B. de Faria Baricelli et A.Marty.

Références

- Casalta, E., Aguera, E., Picou C., Rodriguez-Bencomo, JJ., Salmon, JM., Sablayrolles, JM. A comparison of laboratory and pilot-scale fermentations in winemaking condition. *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 87:1665–1673.
- Dambergs, R. G.; Sparrow, A. The "Bodum French Press": a simple, reliable, small-lot fermentation method. (2010) Poster, 14th AWITC.
- Feinberg M., Validation Interne des méthodes d'analyse. 224p.
- Sparrow, A. M., Smart, R. E., Fermentation Volume Studies for Red Wine Experimentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* (2015) 36: 343-346

