

# RÔLE DE LA SOUCHE DE LEVURE SUR LES COMBINAISONS DU DIOXYDE DE SOUFRE DES VINS ISSUS DE RAISINS BOTRYTISÉS ET PASSERILLÉS

## YEAST STRAINS ROLE ON THE SULPHUR DIOXYDE COMBINATIONS OF WINES OBTAINED FROM NOBLE ROT AND RAISING GRAPES

Isabelle MASNEUF<sup>1</sup> et \* et D. DUBOURDIEU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Chargée de recherches SARCO, filiale des sociétés Laffort et Lamothe-Abiet Pinosa, détachée à la Faculté d'Œnologie de Bordeaux.

<sup>2</sup> Faculté d'Œnologie de Bordeaux, Université Victor Segalen, 351, cours de la Libération, 33405 Talence, France.

**Résumé :** L'incidence de quatre souches de levures industrielles et indigènes sur les combinaisons de dioxyde de soufre de vins issus de raisins botrytisés et passerillés est étudiée dans différents crus de la région de Sauternes et un cru de Jurançon. Les analyses des composés cétoniques (acide pyruvique et acide 2-oxo-glutarique), de l'acétaldéhyde et du PC50 réalisées sur les vins après mutage montrent que le choix de la souche de levure constitue un élément à prendre en compte pour limiter les doses de dioxyde de soufre dans les vins.

**Abstract :** The influence of four industrial and indigenous yeast strains on the sulphur dioxide combinations of wines obtained from noble rot and raising grapes is studied in different growth of the Sauternes area and one growth in the Jurançon area. The analysis of ketonic compounds (pyruvic acid and 2-oxo-glutaric acid), acetaldehyde and PC50 on the wines clearly showed significant statistical difference between the yeast strains for the sulphur dioxide combination. By adding the same dosage of sulphiting, the free SO<sub>2</sub> levels are variable depending on the yeast strain used. One strain (Zymaflore ST), isolated from a spontaneous fermentation of a botrytised must, giving wines with low PC50 values, is well adapted for the noble rot must vinification. The choice of the yeast strain is a parameter of importance to limit the sulphur dioxide amount in the wines.

**Mots clés :** *Saccharomyces cerevisiae*, levure, combinaisons SO<sub>2</sub>, pourriture noble

**Key words :** *Saccharomyces cerevisiae*, yeast, SO<sub>2</sub> combinations, noble rot

### INTRODUCTION

Le fort pouvoir de combinaison du dioxyde de soufre des vins issus de raisins botrytisés ou passerillés constitue une préoccupation majeure pour les œnologues. En effet, il est souvent nécessaire de muter ces vins avec des quantités de dioxyde de soufre importante qui conduisent dans les vins à des teneurs en SO<sub>2</sub> total supérieure à 400 mg/L (limite légale autorisée) afin d'obtenir des valeurs de SO<sub>2</sub> libre suffisante à leur stabilité microbiologique au cours de l'élevage. La présence de fortes concentrations en composés carbonyles (aldéhydes et cétones) produits du métabolisme de *Botrytis cinerea* explique en partie les combinaisons du SO<sub>2</sub> dans le cas particulier des vins de pourriture noble (BLOUIN, 1966 ; GUILLOU, 1996). Par ailleurs, lorsque la richesse en sucre du moût est élevée, les

levures de vinification ont un métabolisme fermentaire dévié en faveur de la fermentation glycéro-pyruvique. Ce phénomène est accru par la présence d'une substance antifongique de nature polysaccharidique produite par *Botrytis cinerea* (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1952 ; LAFOURCADE, 1955). Les levures produisent alors des quantités plus élevées en glycérol et acide acétique que dans le cas de la fermentation d'un moût de raisin sain (DUBOURDIEU, 1982). En outre, elles libèrent de l'acétaldéhyde et des teneurs importantes en composés cétoniques (acide pyruvique et acide 2-oxoglutarique). Ces derniers présents dans les vins à des doses non négligeables de l'ordre d'une centaine de mg/L (BLOUIN et PEYNAUD, 1963) jouent un rôle important dans les bilans de combinaison du dioxyde de soufre.

Dans ce travail, nous étudions l'incidence de la souche de levure de vinification dans la production de composés impliqués dans les phénomènes de combinaison de dioxyde de soufre des vins issus de raisins botrytisés et passerillés.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### I - SOUCHES DE LEVURES

Les souches de levures industrielles utilisées sont présentées dans le tableau I. Elles appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

### II - DÉROULEMENT DES FERMENTATIONS

Les expérimentations sont mises en place dans 3 crus de la région Sauternes, un cru de la région de Barsac et un cru de la région de Jurançon (Millésime 1995 et 1996). Les caractéristiques des crus et des moûts utilisés sont décrites dans le tableau II. Dans chaque cru, un même moût est réparti dans quatre barriques identiques, puis inoculé par les Levures Sèches Actives à la dose de 20 g/hL ; pour les moûts issus de raisins botrytisés, une barrique témoin n'est pas levurée. À mi-fermentation, un prélèvement stérile de moût est réalisé afin de contrôler l'implantation des levures industrielles. Un aliquot de 100 µL est étalé sur milieu YPG solide (Yeast extract 10 g/L, Bactopeptone 10 g/L, Glucose 20 g/L et agar 20 g/L). Après 48 heures de croissance à 25°C, l'implantation des souches de levure est vérifiée par l'analyse PCR associée aux séquences

*delta* réalisée sur cellules entières (MASNEUF et DUBOURDIEU, 1994). Lorsque l'équilibre sucre-alcool recherché est atteint, la fermentation alcoolique est arrêtée avec de l'anhydride sulfureux à la dose de 17 à 25 g/hL selon les moûts.

### III - ANALYSE DES LEVURES INDIGÈNES ISOLÉES DE FERMENTATIONS SPONTANÉES

Des échantillons de moûts en fermentations sont prélevés à deux stades de la fermentation alcoolique (milieu et avant mutage) dans les barriques non levurées des crus de Barsac et de Sauternes. Chaque échantillon est dilué, puis étalé sur boîte de Pétri et 30 colonies sont prélevées au hasard. Chaque colonie est répliquée sur milieu solide, puis conservée à -20°C dans un milieu YPG liquide additionné de 25 p. cent de glycérol. L'identification des levures ainsi isolées est réalisée par l'analyse des caryotypes en électrophorèse en champs pulsés (FREZIER ET DUBOURDIEU, 1992).

### IV - DOSAGES ENZYMATIQUES

Les teneurs en acide pyruvique, acétaldéhyde et acide 2-oxoglutarique sont déterminées par un dosage enzymatique qui consiste à mesurer l'apparition ou la disparition du NADH par lecture de l'absorbance à 340 nm (Kit enzymatique Boehringer Mannheim).

### V - MESURE DU PC50

La détermination du pouvoir de combinaison (PC 50) a été établie par CHAUVET (1981). C'est une

**TABLEAU I**  
**Souches de levures utilisées**

**Table I - Strains of used yeasts**

Souches	N° CLIB <sup>1</sup>	Origine	Dénomination commerciale
BO213	-	Lallemand	Actiflore Bayanus
VL3c	2016	Faculté d'Œnologie de Bordeaux	Zymaflore VL3c
ST	2026	Faculté d'Œnologie de Bordeaux	Zymaflore ST
EG8	2030	INRA Colmar	Levuline ALS

<sup>1</sup>CLIB : collection de levure d'intérêt biotechnologique (Thiverval-Grignon, France)

**TABLEAU II**  
**Origine des moûts utilisés pour les expérimentations**

**Table II - Origin of musts used for experiments**

Crus	Appellation	Cépage	Trie
C I 95(Coutet)	Barsac	Sémillon	première
C I 95(Coutet)	Barsac	Sémillon	dernière
G 95 (Guiraud)	Sauternes	Sauvignon	première
Y 96 (Yquem)	Sauternes	Sémillon	-
S 96 (Suduiraut)	Sauternes	Sémillon	dernière
Cau I 96 (Cauhapé)	Jurançon	Petit-manseng	première
Cau II 96 (Cauhapé)	Jurançon	Petit-manseng	dernière

estimation de la quantité de dioxyde de soufre qu'il faut ajouter à un vin pour avoir 50 mg/L de dioxyde de soufre libre.

## VI - ANALYSES STATISTIQUES

Les teneurs en acide pyruvique, acétaldéhyde, acide 2-oxoglutarique et les valeurs du PC50 sont soumises à une analyse de variance à deux facteurs (souche de levure/moût) sans répétition au seuil  $\alpha = 0,01$  (ANOVA, Statbox Software<sup>®</sup>). Dans le cas où des différences statistiquement significatives existent entre les souches, la signification des écarts est étudiée par un test de comparaison de moyennes de Newman-Keuls ( $\alpha = 0,05$ ; Statbox Software<sup>®</sup>).

## RÉSULTATS

### I - CONTRÔLE D'IMPLANTATION ET ANALYSE DES POPULATIONS DE LEVURE DES FERMENTATIONS SPONTANÉES

Les analyses comparatives des profils d'amplification des Levures Sèches Actives et des levures isolées à mi-fermentation obtenus par la méthode PCR associée aux séquences *delta* montrent que l'ensemble des souches industrielles se sont implantées pour les 7 expérimentations décrites dans le tableau II.

Parallèlement à ces contrôles, l'étude systématique des levures indigènes présentes dans les fermentations spontanées des moûts issus de raisins botrytisés des crus C, G et S est réalisée par l'analyse des caryotypes en électrophorèse en champs pulsés. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau III. Les 99 colonies isolées appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Leurs caryotypes se distinguent de ceux des levures industrielles utilisées pour chaque expérimentation. Ainsi, les fermentations spontanées se sont déroulées en présence de levures indigènes sans contamination par des levures industrielles. Pour les quatre crus étudiés, les populations de levure sont très hétérogènes ; la présence d'une souche de levure dominante n'est pas mise en évidence, la fréquence d'apparition du caryotype le plus représenté variant entre 17 à 32 p. cent.

### II - MESURE DU PC50 ET DES TENEURS EN COMPOSÉS D'ORIGINE LEVURIENNE QUI COMBINENT LE DIOXYDE DE SOUFRE

Les teneurs en acide pyruvique, acétaldéhyde et 2-oxoglutarique ainsi que les valeurs du PC50 mesurées dans les vins liquoreux après mutage sont rapportées dans le tableau IV. Pour un cru donné, le mutage a été effectué au même équilibre alcool/sucre pour chaque levure. Il existe une bonne corrélation entre les

**TABLEAU III**  
**Analyses des populations de levures présentes dans les fermentations spontanées**

**Table III - Analyze of present yeast populations in spontaneous fermentations**

Cru	Nombre de colonies analysées	Fréquence d'apparition du caryotype le plus représenté (en %)
C I 95 <sup>a</sup>	58	17
C II 95 <sup>a</sup>	58	21
G 95 <sup>a</sup>	55	20
S 96 <sup>b</sup>	28	32

a : Deux prélèvements sont réalisés, à mi-fermentation et avant mutage.

b : Un prélèvement est réalisé à mi-fermentation.

teneurs en ces composés, variables selon la souche de levure et le pouvoir de combinaison des vins estimé par le PC50. Les souches de levures qui produisent les plus fortes teneurs en acide pyruvique, 2-oxoglutarique et en acétaldéhyde présentent également les valeurs les plus élevées du PC50. Par ailleurs, les teneurs en acide pyruvique, 2-oxoglutarique, acétaldéhyde et les valeurs du PC50 sont significativement différentes en fonction de la souche de levure utilisée. La souche BO213 est statistiquement différente par rapport aux souches industrielles ST, VL3c et aux levures indigènes pour la production d'acide pyruvique et d'acide 2-oxoglutarique. Concernant les teneurs en acétaldéhyde, seule la souche BO213 est significativement différente par rapport aux levures indigènes. Enfin, les vins fermentés par les souches BO213 et VL3c combinent significativement plus le dioxyde de soufre que ceux obtenus avec la souche ST et les levures indigènes.

Des résultats similaires sont obtenus pour les deux expérimentations réalisées sur du moût issu de raisins passerillés. Les souches industrielles BO213 et EG8 produisent les plus fortes teneurs en acide pyruvique et acétaldéhyde. Les vins fermentés par ces deux souches de levures présentent des valeurs du PC50 les plus élevées pour les deux expérimentations réalisées (tableau V). Il faut un supplément de 42 mg/L de dioxyde de soufre pour obtenir une valeur de SO<sub>2</sub> libre de 50 mg/L pour le vin fermenté par BO213 dans l'essai Cau I 96 par rapport à celui fermenté par ST.

## CONCLUSION

Il était connu que le pouvoir de combinaison des moûts et des vins issus de raisins botrytisés est variable selon le stade de développement du champignon et le millésime. Nous avons montré que, pour un même moût, la souche de levure de vinification joue un rôle significatif dans les phénomènes de combinaison des

TABLEAU IV

**Influence de la souche de levure sur les teneurs (mg/L) en acide pyruvique, acide 2-oxo-glutarique, en acétaldéhyde et sur le pouvoir de combinaison (PC50) dans des vins issus de raisins botrytisés de l'appellation Sauternes (millésime 1995 et 1996)**

**Table IV - Influence of yeast strain on contents (mg/L) in pyruvic acid, 2-oxo-glutaric acid, in acetaldehyde and on the capacity of combination (PC50) in wines obtained from noble rot grapes of Sauternes (vintage year 1995 and 1996)**

	Cru C I 95	Cru C II 95	Cru G 95	Cru Y 96	Cru S 96	Moyenne*
Titre alcoométrique (%) vol.	14,6	15,3	13,7	13,3	15,8	
Sucres (g/l)	97	100	104	120	58	
Acide pyruvique						
BO213	61	167	107	156	95	117 <b>a</b>
VL3c	44	85	122	41	25	63 <b>b</b>
Indigène	28	70	62	42	42	49 <b>b</b>
ST	34	62	73	22	30	44 <b>b</b>
Acide 2-oxoglutarique						
BO213	112	173	112	138	100	130 <b>a</b>
VL3c	59	104	103	158	68	90 <b>b</b>
Indigène	63	82	71	168	31	79 <b>b</b>
ST	55	105	98	127	66	89 <b>b</b>
Acétaldéhyde						
BO213	53	56	42	48	77	55 <b>a</b>
VL3c	59	41	40	45	65	50 <b>a b</b>
Indigène	44	42	28	45	64	45 <b>b</b>
ST	58	41	35	44	70	50 <b>a b</b>
PC 50						
BO213	274	356	453	275	321	336 <b>a</b>
VL3c	276	338	308	285	258	293 <b>a</b>
Indigène	234	355	319	225	269	280 <b>b</b>
ST	258	325	292	245	232	270 <b>b</b>

\* Les valeurs suivies de différentes lettres sont statistiquement différentes (analyse de variance à 2 facteurs sans répétition,  $p < 0,01$ )

vins de pourriture noble. Le même phénomène est mis en évidence, pour la première fois, pour les vins issus de raisins passerillés. Ainsi, à dose égale de sulfitage, les teneurs en SO<sub>2</sub> libre varient selon la souche de levure utilisée. La souche BO213, pourtant longtemps couramment utilisée dans la région de Sauternes, est fortement productrice d'acide pyruvique, d'acétaldéhyde et d'acide 2-oxoglutarique. Toutes conditions égales, les vins fermentés par cette souche de levure combinent plus le dioxyde de soufre. En revanche, la souche ST et les levures indigènes s'avèrent particulièrement adaptées à la vinification des moûts de pourriture noble. La souche ST a d'ailleurs été isolée, au sein de notre laboratoire, à partir de la microflore indigène d'une fermentation spontanée de moût de pourriture noble. Il semble que cette souche de levure, isolée d'un milieu riche en sucre, au contact de la « botryticine », soit mieux adaptée à la fermentation des moûts de pourriture noble par rapport aux autres levures industrielles. L'étude du déterminisme génétique à l'origine de ces phénomènes d'adaptation et des variations observées selon les souches doit nous permettre d'affiner la sélection

TABLEAU V

**Influence de la souche de levure sur les teneurs en acide pyruvique, en acétaldéhyde et sur le pouvoir de combinaison (PC50) dans des vins issus de raisins passerillés de l'appellation Jurançon (millésime 1996)**

**Table IV - Influence of yeast strain on contents in pyruvic acid, in acetaldehyde and on the capacity of combination (PC50) in wines obtained from raisining grapes of Jurançon (vintage year 1996)**

	Acide pyruvique (mg/L)	Acétaldéhyde (mg/L)	PC50
Cau I 96			
BO213	13	68	212
EG8	61	65	189
VL3c	7	56	180
ST	7	53	170
Cau II 96			
BO213	76	42	208
EG8	78	45	211
VL3c	26	33	206
ST	27	44	194

tion des levures. C'est une des voies intéressantes pour limiter les doses de dioxyde de soufre, produit indispensable pour la stabilisation des vins.

Remerciements : Les auteurs remercient les châteaux Coutet, Suduiraut, Guiraut, Yquem et le domaine Cauhapé pour leur collaboration ainsi que la société SARCO (filiales des sociétés Laffort et Lamothe-Abiet Pinosa) pour le support financier déterminant qu'elle a apporté à cette étude.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLOUIN J., 1966. Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins. Thèse Docteur-Ingénieur, Bordeaux.
- BLOUIN J. et PEYNAUD E., 1963. Présence constante des acides pyruvique et céto-2-glutarique dans les moûts de raisins et les vins. *C. R. Acad. Sc.*, **256**, 4521-4522.
- CHAUVET S., 1981. Application de l'isotacophorèse au dosage des principaux acides du vin. Relation entre la composition chimique des vins blancs doux et la qualité de la vendange utilisée. *Thèse doctorat*, Université Bordeaux II.
- DUBOURDIEU D., 1982. Recherches sur les polysaccharides sécrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin, *Thèse doctorat ès Sciences*, Université Bordeaux II.
- FREZIER V. et DUBOURDIEU D., 1992. Ecology of yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, n°4, 375-380.
- GUILLOU I., 1996. Étude de substances de faible poids moléculaire combinant le dioxyde de soufre dans les vins blancs issus de vendanges botrytisées. Mise en évidence et importance du rôle de l'hydroxypropional. *Thèse doctorat œnologie-ampélogie*, Université de Bordeaux II.
- LAFOURCADE S., 1955. Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisins. *Thèse ingénieur-docteur*, Université de Bordeaux.
- MASNEUF I. et DUBOURDIEU D., 1994. Comparaison de deux techniques d'identification des souches de levures de vinification basées sur le polymorphisme de l'ADN génomique : Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse des caryotypes (électrophorèse en champ pulsé). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28**, n°2, 153-160.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E. et LAFOURCADE S., 1952. Sur la formation de substances inhibitrices de la fermentation alcoolique par *Botrytis cinerea*. *C. R. Acad. Sc.*, **234**, 478.

---

Reçu le 9 novembre 1999  
accepté pour publication le 17 janvier 2000

---