

## HYDROLYSE DU FOLPEL - INCIDENCE SUR LE DÉCLENCHEMENT DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

### FOLPET HYDROLYSIS - INCIDENCE ON THE INITIATION OF THE ALCOHOLIC FERMENTATION

Efimia HATZIDIMITRIOU, Ph. DARRIET, A. BERTRAND et D. DUBOURDIEU

Faculté d'Œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2,  
351, cours de la libération - 33405 Talence cedex (France)

**Mots clés :** folpel, hydrolyse, jus de raisin, *Saccharomyces cerevisiae*

**Key words :** folpet, hydrolysis, grape juice, *Saccharomyces cerevisiae*

Le folpel est un fongicide de contact très employé seul ou en association avec d'autres fongicides pour la protection phytosanitaire du vignoble, en particulier contre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*). Cependant, le folpel est inhibiteur des levures *Saccharomyces cerevisiae* comme le sont d'autres fongicides de la famille des phthalimides (captane) (PEYNAUD, 1954) ou des sulfamides (dichlofluanide) (DVORAK ET SCHOPFER, 1970 ; SAPISDOMERCQ *et al.*, 1978). Cette inhibition se traduit par un retard dans le déclenchement de la fermentation alcoolique (LEMPERLE et KERNER, 1969 ; GRINBAUM, 1992) voire par des difficultés dans leur achèvement (DUBERNET *et al.*, 1990). Paradoxalement, le folpel n'est jamais retrouvé dans les vins (BRUN et MESTRES, 1990).

Des études menées sur le captane puis sur le folpel, ont mis en évidence l'hydrolyse rapide de ces fongicides à pH neutre ou pH alcalin (DAINES *et al.*, 1957 ; WOLFE *et al.*, 1976). DVORAK et SCHOPFER (1970) ont rapporté des résultats identiques pour la dichlofluanide et indiqué que son hydrolyse dans le jus de raisin permet de lever l'inhibition des levures.

Dans cette note, nous présentons les premiers résultats d'un travail mené sur le devenir du folpel dans le moût de raisin et sur la relation entre le comportement de ce fongicide et le déclenchement de la fermentation alcoolique.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### I — COMPOSITION DU MILIEU MODÈLE

Le milieu modèle contient 200 g de saccharose, 5 g d'acide tartrique q.s.p. l litre d'eau ultrapure ; le pH est ajusté à 3,5.

#### II — DOSAGE DU FOLPEL ET DU PHTHALIMIDE DANS LES JUS DE RAISIN ET DANS LE MILIEU MODÈLE

25 ml de jus de raisin ou de milieu modèle sont additionnés de 50 µl d'étalon interne [solution éthanolique de lindane (hexachlorocyclohexane) à 1,4 g/l], puis extraits, dans une fiole de 50 ml, durant 5 minutes, par agitation magnétique (700 r.p.m.), successivement par 7, 3 et 2 ml d'acétate d'éthyle (qualité Pestipur, SDS, Peypin). Après décantation statique pendant 5 minutes, les phases organiques sont récupérées, rassemblées puis séchées à l'aide de sulfate de sodium anhydre. L'extrait est concentré à 1 ml sous débit d'azote de 100 ml/min.

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard HP5890-II, comportant un système d'injection « on-column », et couplé à un spectromètre de masse Hewlett-Packard HP5972 (mode impact électronique 70 eV, 250°C). 1 µl de l'extrait est injecté dans une colonne capillaire de type BPX5 (SGE, Glen Osmond, Australie) de longueur 50 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur du film 0,5 µm. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium N55 avec 55 kPa de pression en tête de colonne. Le programme de température est le suivant : isotherme initial à 60°C, 1 min, puis programmation de température à raison de 3°C/min jusqu'à 230°C avec un isotherme final de 20 min.

L'identification du folpel et du phthalimide est effectuée par comparaison avec les temps de rétention des pics de composés purs : folpel\* (Ehrenstorfer, Allemagne) et phthalimide\*\* (Aldrich, France) ainsi que par interprétation des spectres de masse.

\*2-[(trichlorométhyl)thio]-1*H*-isoindole-1,3 (2*H*)-dione

\*\*1*H*-isoindole-1,3 (2*H*)-dione

Pour l'analyse quantitative, nous utilisons un mode de détection par sélection d'ions spécifiques (SIM) du folpel (260, 297), du phthalimide (76, 104, 147) et de l'étalon interne (109, 181, 183). La répétabilité de l'analyse a été étudiée pour deux séries d'échantillons de jus de raisins, additionnés avec du folpel (104 µg/l et 3,1 mg/l). L'étude statistique a été effectuée sur 9 dosages consécutifs pour chaque série d'échantillons. Le coefficient de variation est de 1,95 p. cent pour la faible teneur en folpel et de 5,27 p. cent pour la teneur la plus élevée. La répétabilité a également été étudiée pour le phthalimide (1 mg/l) ; le coefficient de variation est alors de 1,05 p. cent. Dans nos conditions de travail, le rapport de la surface des pics du folpel et du phthalimide à celle de l'étalon interne varie linéairement dans la gamme des concentrations respectives de 1 à 4 mg/l et de 1 à 3 mg/l. La sensibilité de dosage est de 0,01 mg/l pour le folpel et de 0,05 mg/l pour le phthalimide.

La décomposition thermique du folpel a été signalée dans la littérature (LIAO *et al.*, 1991). Lors d'analyses préliminaires d'extraits de jus de raisins par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse et injection en mode « splitless » (250°C), nous avons également constaté l'apparition d'anhydride phthalique. Aussi, convient-il d'utiliser un mode d'injection « on-column » pour le dosage du folpel et du phthalimide.

### III — DÉROULEMENT DES MICROVINIFICATIONS

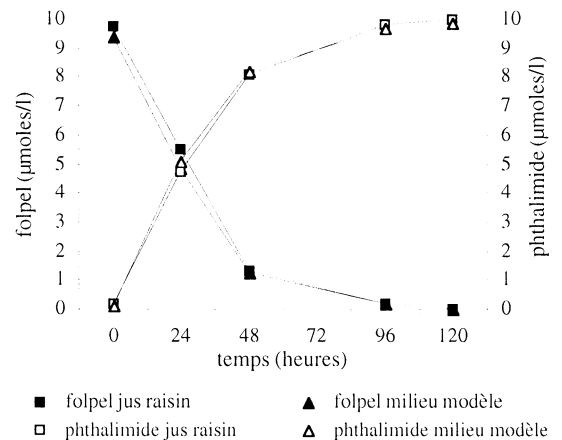
Les microvinifications sont réalisées sur jus de raisin de Sauvignon filtré stérilement (turbidité inférieure à 4 N.T.U. ; sucres 204 g/l ; acidité totale 3,1 g/l en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; pH 3,5 ; dioxyde de soufre libre 30 mg/l). Les fermentations se déroulent en bouteilles bordelaises de 375 ml remplies avec 300 ml de jus, surmontées de barboteurs, dans une chambre climatisée à 20°C. Les jus sontensemencés par des levures sèches actives (*Saccharomyces cerevisiae* souche EG8) à raison d'environ 5.10<sup>6</sup> cellules/ml. Pour chaque essai, on réalise deux répétitions. La fermentation alcoolique est suivie par mesure de la perte de poids ; le début de la fermentation est noté par une perte de poids de 1 g.

## RÉSULTATS-DISCUSSION

### I — MISE EN ÉVIDENCE DE L'HYDROLYSE DU FOLPEL DANS UN JUS DE RAISIN - INCIDENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DU PH

Nous avons suivi l'évolution des teneurs en folpel et en phthalimide dans le jus de raisin et dans le milieu modèle additionnés de 3 mg de folpel par litre.

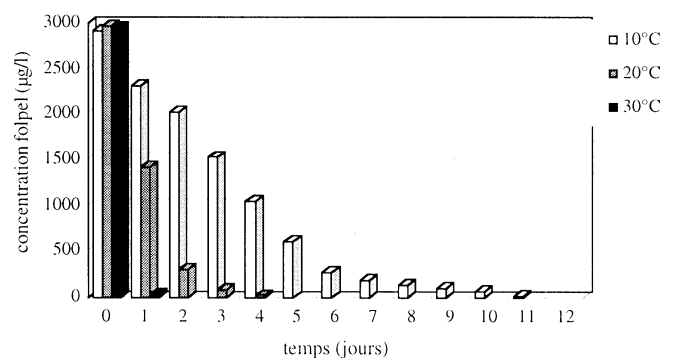
A 20°C, aussi bien dans le milieu modèle que dans le jus de raisin, le folpel se dégrade rapidement, 50 p. cent dans les 24 premières heures, 87 p. cent après 48 heures et 100 p. cent en 120 heures (figure 1). Dans nos conditions, 3 mg/l soit 10 µmole/l de folpel ont disparu par hydrolyse en formant le phthalimide, produit stable, dont le nombre des moles formées correspond au nombre de moles initiales de folpel ± 10 p. cent.



**Fig. 1 - Cinétiques de dégradation du folpel et d'apparition de phthalimide dans un jus de raisin et dans un milieu modèle (20°C, pH 3,5)**

**Fig. 1 — Degradation of folpet to phthalimide in grape juice and model solution (20°C, pH 3.5)**

L'incidence du pH et de la température de conservation ont été étudiés sur le moût de raisin. On constate une forte incidence de la température de conservation du jus de raisin sur la cinétique d'hydrolyse du folpel. Ainsi à 30°C, la presque totalité du folpel (99,6 p. cent) est dégradée dans les 24 heures alors qu'à 10°C, le même résultat est atteint seulement au bout de 12 jours (figure 2). Dans un jus de raisin à pH 3,5,



**Fig. 2 — Incidence de la température de conservation du jus de raisin sur la vitesse de dégradation du folpel (pH 3,5)**

**Fig. 2 — Effect of the grape juice's conservation temperature on the degradation rate of folpet (pH 3.5)**

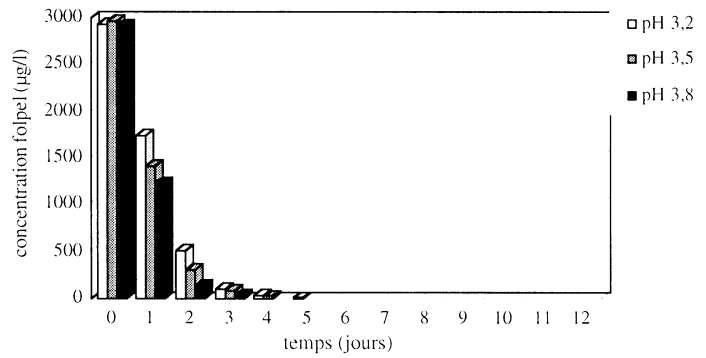
le temps de demi-vie du folpel est de 12 heures à 30°C pour 72 heures à 10°C. Le pH du jus de raisin a aussi une incidence significative sur la cinétique d'hydrolyse ; la dégradation est nettement plus rapide à pH 3,8 qu'à pH 3,2 (figure 3).

L'hydrolyse du folpel avait seulement été envisagée à pH neutre (WOLFE *et al.*, 1976). En fait, nous mettons en évidence que l'hydrolyse de ce fongicide se manifeste aussi au pH du jus de raisin et d'autant plus rapidement que la température est élevée. Cette observation rejoint celle de WOLFE *et al.* pour le captane. L'hydrolyse du folpel est aussi dépendante du pH, contrairement aux résultats de ces mêmes auteurs, qui n'avaient pas noté de différence dans la cinétique d'hydrolyse du captane entre pH 2 et 6.

**II — RELATION ENTRE LES PHÉNOMÈNES D'HYDROLYSE DU FOLPEL ET LE DÉCLENCHEMENT DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE**

Nous avons suivi l'évolution de la fermentation alcoolique d'un jus de raisin additionné de 0,5, 1, 2 et 3 mg de folpel par litre (pH 3,5 ; température 20°C) et ensemencé avec *S. cerevisiae* (souche EG8) soit immédiatement, soit à des temps différés de 24, 48 et 72 heures. Dans le témoin, comme dans le moût contenant 0,5 mg/l de folpel, la fermentation alcoolique démarre dans les 24 heures. Par contre, dans les moûts contenant 1, 2 et 3 mg/l de folpel et ensemencés immédiatement après l'addition du fongicide, le début de la fermentation alcoolique est retardé de 24 heures pour 1 mg/l de folpel, de 48 heures pour 2 mg/l et de 72 heures pour 3 mg/l (tableau I).

Avec un ensemencement différé de 24 heures par



**Fig. 3 — Incidence du pH du jus de raisin sur la vitesse de dégradation du folpel (T° 20°C)**

**Fig. 3 — Effect of the grape juice's pH on the degradation rate of folpel (T° 20°C)**

rapport à l'addition du folpel, la fermentation alcoolique démarre dans les 24 heures en présence de 0,5 et 1 mg/l de folpel mais seulement après 36 heures en présence de 2 mg/l de folpel et 48 heures avec 3 mg/l. Si l'ensemencement est différé de 48 heures, la fermentation avec 2 mg de folpel par litre débute au bout de 24 heures soit avec un délai identique à celui observé dans le moût ne contenant pas de folpel. Le phénomène est le même pour une addition de 3 mg de folpel par litre (tableau I).

Les fermentations alcooliques se sont achevées dans tous les cas, mais plus ou moins rapidement en fonction de la dose initiale de folpel et du stade d'ensemencement. Pour les moûts additionnés de 2 et 3 mg/l de folpel, les fermentations avec ensemencement retardé de 48 heures se sont terminées au moins aussi vite que celles avec ensemencement immédiat (figure 4).

**TABLEAU I**

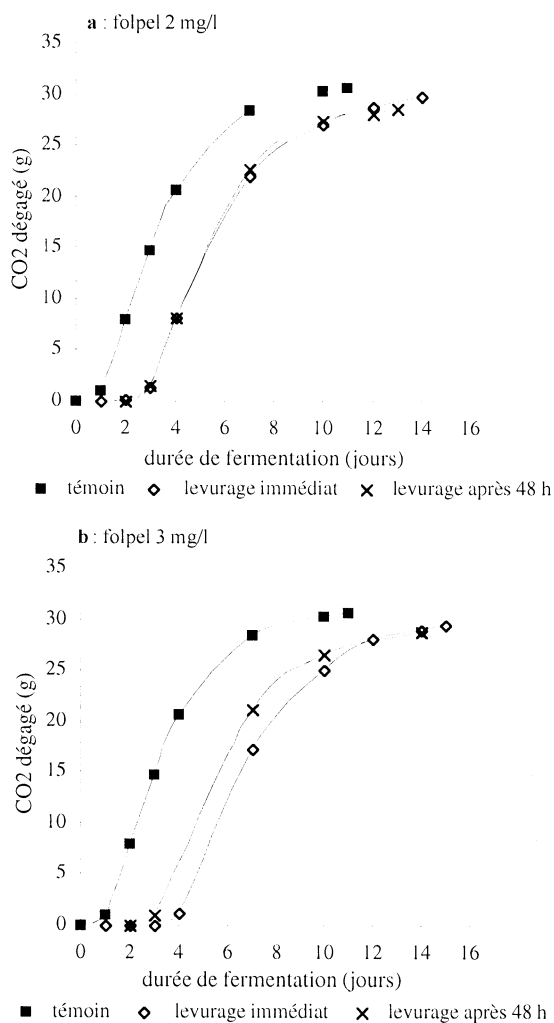
**Délais nécessaires pour observer le départ de la fermentation alcoolique (F.A.) en fonction du temps écoulé entre l'addition de folpel et l'ensemencement**

**Table I — Time necessary to observe the initiation of the alcoholic fermentation in relation with the time elapsed between folpel addition and yeast supplementation**

Quantité de folpel ajoutée (mg/l)	Temps entre l'addition de folpel et l'ensemencement (heures)			
	0	24	48	72
0,5	24	24	24	24
1	48	24	24	24
2	72	36	24	24
3	96	48	24	24

Dans le moût ne contenant pas de folpel, le départ de la F.A. est observé 24 heures après l'ensemencement

Ainsi, l'inhibition des levures *S. cerevisiae* dans le jus de raisin en présence de résidus de folpel, symbolisée par un retard dans le déclenchement de la fermentation alcoolique en présence de 1 mg/l de folpel, s'estompe dans nos conditions, après 24 ou 48 heures de conservation du jus de raisin à 20°C, selon la teneur initiale en résidus de fongicide dans le moût. Cette levée d'inhibition est corrélée avec une hydrolyse du fongicide dans le jus de raisin, ce qui permet de penser que les problèmes de déclenchement de la fermentation alcoolique en présence de résidus de ce fongicide, sont uniquement liés au folpel mais pas à ses produits de dégradation. En outre, l'achèvement rapide des fermentations alcooliques, lorsque l'ensemencement levurien est effectué après hydrolyse du fongicide, conforte l'idée d'une faible toxicité des produits de dégradation du folpel et du phthalimide, en particulier, vis-à-vis des levures (LUKENS et SISLER, 1958).



**Fig. 4 a, b — Cinétiques de fermentation en présence de 2 mg/l et 3 mg/l de folpel**

**Fig. 4 a, b — Fermentation curves in presence of 2 mg/l and 3 mg/l of folpel**

## CONCLUSION

Dans cette note, nous montrons que le folpel s'hydrolyse dans le jus de raisin en donnant du phthalimide. La cinétique est dépendante de la température de conservation du jus de raisin et de son pH. Ce résultat permet d'apporter une interprétation à l'absence systématique de ce fongicide dans les vins.

Le comportement chimique du folpel dans le jus de raisin permet de considérer à nouveau les problèmes d'inhibition de la fermentation alcoolique dont il est la cause. Ainsi, l'inhibition dans le déclenchement de la fermentation alcoolique constatée lorsque la teneur en résidus de folpel atteint 1 mg/l, disparaît après hydrolyse de ce composé. Les fermentations alcooliques s'achèvent alors correctement et les produits de dégradation du folpel, dont la nature doit être précisée, n'exercent visiblement aucune inhibition sur le déroulement de la fermentation alcoolique. L'adaptation du stade d'ensemencement avec des levures sèches actives constitue vraisemblablement un moyen pour assurer une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique des jus de raisins contenant des résidus de folpel.

Cependant, d'autres aspects sont aussi à prendre en considération. Il s'agit en particulier de l'incidence des modalités de traitements fongicides sur la teneur en folpel dans les raisins, de l'évolution des teneurs en folpel au cours de la phase préfermentaire de la vinification, comme l'incidence de la souche de levure sur la cinétique fermentaire en présence de résidus de ce fongicide et de ses produits de dégradation. Ces différents aspects feront l'objet d'une prochaine publication.

**Remerciements :** Nous remercions Monsieur Christian POUPOT, technicien de la Faculté d'Œnologie pour son aide, ainsi que le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux qui a financé ces travaux.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BRUN S. et MESTRES G., 1990. Incidences qualitatives de la lutte phytosanitaire en œnologie. *Bull. O.I.V.*, **713-714**, 571-579.
- DAINES R.H., LUKENS R.J. BRENNAN E. et LEONE I.A., 1957. Phytotoxicity of captan as influenced by formulation, environment and plant factors. *Phytopathology*, **47**, 567-574.
- DUBERNET M, FORTUNE G. et SIMON F., 1990. Enquête : produits de traitement de la vigne et accidents de fermentation. *Rev. Fr. œnologie*, **123**, 35-43.
- DVORAK V. et SCHOPFER J.F., 1970. Rémanence de l'Euparène et vinification. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **2**, 99-104.

- GRINBAUM M., 1992. Compte rendu des essais réalisés par l'I.T.V. de 1989 à 1991, concernant les résidus de folpel dans le raisin, le moût, le vin : leur influence sur les levures et éventuellement les fermentations. *Actes Symp. « Folpel : vigne et vin »*, 25 mars 1992, Bordeaux, France.
- LEMPERLE E. und KERNER E., 1969. Wirkstoffrückstände und Gärbeeinflussungen nach Anwendung von Basfungin, Euparen und Ortho-Phaltan im Weinbau. *Die Wein-Wissenschaft*, **24**, n°10, 357-371.
- LIAO W., JOE T. et CUSICK W. G., 1991. Multiresidue screening method for fresh fruits and vegetables with gas chromatographic/mass spectrometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, n°3, 554-565.
- LUKENS R.J., SISLER H.D., 1958. Chemical reactions involved in the fungitoxicity of captan. *Phytopathology*, **48**, 235-244.
- PEYNAUD E., 1954. Essai biologique de la stabilité de certains fongicides de synthèse. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, **2**, 83-87.
- SAPIS-DOMERCQ S., BERTRAND A., JOYEUX A, LUCMARET V. et SARRE C., 1978. Étude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Expérimentation 1977. Comparaison avec les résultats de 1976 et 1975. *Connaissance Vigne Vin*, **12**, n°4, 245-275.
- WOLFE N.L., ZEPP R.G., DOSTER J.C. et HOLLIS R.C., 1976. Captan hydrolysis. *J. Agric. Food Chemistry*, **24**, n°5, 1041-1045.

Note reçue le 30 janvier 1997

