

MISE EN ÉVIDENCE ET INTERPRÉTATION DE L'APTITUDE DES LIES À ÉLIMINER CERTAINS THIOLS VOLATILS DU VIN

DEMONSTRATION AND INTERPRETATION OF THE YEAST LEE ABILITY TO ADSORB CERTAIN VOLATILE THIOLS CONTAINED IN WINE

Valérie LAVIGNE* et D. DUBOURDIEU

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

Résumé : L'addition de lies fraîches ou de parois de levures à une solution modèle renfermant de l'éthanethiol et du méthaneethiol conduit à la disparition complète de ces deux composés. Nous montrons que la fixation de ces thiols volatils du vin par les levures met en jeu la formation de ponts disulfures avec la cystéine constitutive des mannoprotéines localisées dans la couche externe de la paroi de levure.

Abstract : Yeast lees isolated from wine or a culture medium after fermentation have the particular property of being able to adsorb certain volatile thiols contained in a hydroalcoholic wine-like solution. Yeast cell-walls are also able to adsorb the same thiols when prepared by mechanical disruption of whole cells in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol (DTT). Thiols adsorbed in this manner may be re-released from the cell-walls by the addition of DTT in the medium. On the other hand, yeast cell-walls prepared under the same conditions lose their adsorption capacity following hydrolysis with a beta-glucanase preparation able to release mannoproteins. These results indicate that volatile thiols combine with the yeast cell-walls by means of disulphide bonds with the cysteine contained in mannoproteins.

Mots-clés : lies de levures, thiols, adsorption, parois cellulaires

Key words : yeast lees, thiols, adsorption, wall-cells

INTRODUCTION

L'élevage sur lies des vins blancs secs est un procédé traditionnel dont les avantages œnologiques sont aujourd'hui mieux connus. Les lies atténuent l'impact olfactif et gustatif du bois (CHATONNET *et al.*, 1992); les composés qu'elles cèdent au vin améliorent leur stabilité vis-à-vis des casses tannique et protéique (LEDOUX *et al.*, 1992; DUBOURDIEU et MOINE, 1995; MOINE-LEDOUX, 1996). De plus, en présence de lies, certains arômes du vin sont mieux protégés contre l'oxydation, notamment pendant l'élevage en fûts neufs. Le principal risque associé à ce type d'élevage, particulièrement s'il est effectué en cuve de grande capacité, est le développement de défauts olfactifs de réduction, imputable à la formation de composés soufrés au contact des lies. Nous avons déjà montré (LAVIGNE, 1995) que les vins blancs peuvent toutefois bénéficier d'un élevage sur biomasse totale en cuve en utilisant un procédé simple. Il consiste à soutirer le vin après son sulfitage et à conserver les lies sépa-

rément dans des barriques. Lorsqu'elles sont réincorporées au vin après un mois, on observe une diminution significative de sa teneur en méthaneethiol et éthanethiol. Tout se passe comme si, dans certaines conditions, les lies étaient capables d'éliminer des thiols volatils du vin.

Notre travail se propose de vérifier en milieu modèle puis d'interpréter, cette remarquable propriété des lies de levures.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

La capacité des lies ou des parois de levures à adsorber certains thiols volatils est étudiée dans un milieu modèle (tampon tartrate, THK) de composition proche de celle du vin : éthanol, 12 p. cent v/v ; acide tartrique, 5 g/l ; pH ajusté à 3,5 par de la potasse.

* Chercheur pour la société SEGUIN-MOREAU, détaché à la Faculté d'Œnologie de Bordeaux

1) Préparation des lies à partir d'un vin ou d'une culture de levures

Nous avons utilisé des lies prélevées une quinzaine de jours après la fin de la fermentation alcoolique, dans un vin blanc de Sauvignon du millésime 95 vinifié en cuve et sulfité.

Après centrifugation, les lies sont remises en suspension dans le milieu modèle à raison de 3 p. cent (en poids humide), proportion proche de celle des lies dans un vin blanc sur biomasse totale.

Les lies utilisées proviennent aussi d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* (souche Zymaflore VL3) dans un milieu de composition suivante : glucose 85 g/l, fructose 85 g/l, acide tartrique 3 g/l, acide citrique 0,3 g/l, asparagine 2 g/l, phosphate de potassium (monopotassique) 2 g/l, sulfate d'ammonium 2 g/l, sulfate de magnésium 0,2 g/l, sulfate de manganèse 0,01 g/l, mésoinositol 0,3 g/l, H₂O q.s.p. 1l, pH ramené à 3,5 par KOH. Après autoclavage (10 mn à 105°C), on ajoute 10 ml d'une solution de vitamines stérilisée (biotine 4 mg/l, thiamine 100 mg/l, pyridoxine 100 mg/l, acide pantothénique 100 mg/l, acide para-amino-benzoïque 100 mg/l).

2) Préparation des parois de levures

a) Par broyage de levures entières

Les levures utilisées pour l'obtention des parois sont issues de la fermentation au laboratoire d'un moût de Sauvignon ensemencé par la même levure sèche active (*S. cerevisiae* souche Zymaflore VL3) à raison de 100 mg/l. En fin de fermentation alcoolique, le vin obtenu est centrifugé ; le culot de levures est rincé à deux reprises dans un tampon tartrate (THK). Les levures sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur à billes (Vibrogen Zellmühle type VI 4). 50 ml de levures, additionnées de 25 ml de billes de verre (diamètre 0,5 mm), sont placés dans le broyeur. Elles subissent 4 cycles de 10 minutes comprenant chacun 5 minutes de broyage et 5 minutes de conservation dans un bain glacé. Le broyat est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 5000 rpm. Le culot de parois est rincé par deux fois 100 ml d'eau milliQ avant d'être repris dans 50 ml de tampon THK.

b) Par broyage de levures entières en présence de dithiothréitol, DTT

Le protocole expérimental est identique à celui décrit précédemment, à l'exception des conditions d'isolement des parois. Les levures obtenues après fermentation sont broyées en présence de DTT (1 mM). Le culot de parois, obtenu après centrifugation du broyat, est rincé à trois reprises par de l'eau milliQ.

3) Hydrolyse des parois de levures par le Glucanex

Les levures issues de la fermentation d'un milieu modèle sont broyées en présence de DTT dans les conditions décrites précédemment. Après centrifugation, le culot de paroi est soumis à une hydrolyse enzymatique par une préparation de β -glucanases (Glucanex™, Novo Nordisk) possédant des activités exo- β -(1-3)-, endo- β -(1-3)- et endo- β -(1-6)-glucanases susceptibles d'hydrolyser les glucanes servant de point d'ancrage aux mannoprotéines (DUBOURDIEU *et al.*, 1985). Un tel traitement est donc de nature à éliminer de la paroi la majeure partie de ses mannoprotéines. La digestion des parois isolées est réalisée de la façon suivante. Les parois, reprises dans 25 ml d'eau milliQ sont additionnées de Glucanex (1 p. cent du poids humide de levures obtenu après fermentation du milieu modèle) et placées à 40°C pendant 5 heures. Elles sont ensuite rincées à deux reprises dans du tampon THK.

II — DOSAGE DES COMPOSÉS SOUFRÉS VOLATILS LÉGERS DES VINS

Les composés soufrés volatils légers des vins sont dosés par la technique dite de « l'espace de tête statique » par couplage chromatographie en phase gazeuse-détection par photométrie de flamme selon la méthode décrite par LAVIGNE *et al.* (1993).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I — MISE EN ÉVIDENCE DE L'APTITUDE DES LIES À FIXER CERTAINS THIOLS VOLATILS DU VIN LORS D'UNE AÉRATION

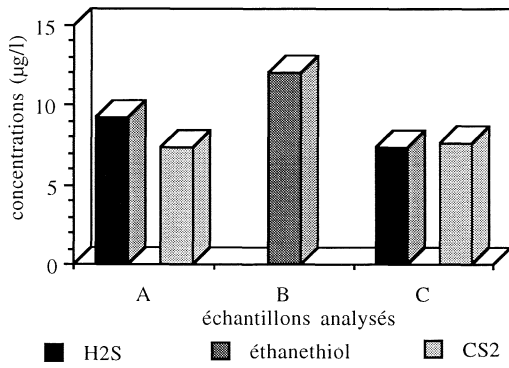
Dans l'ensemble des expériences décrites, l'incorporation des lies ou des parois de levures est associée à une aération du milieu.

1) Adsorption des thiols volatils par des lies fraîches issues d'un vin

On prépare en demi-bouteilles de 375 ml trois échantillons (A, B et C) de composition suivante : A : lies + THK, B : éthanethiol (13 μ g/l) + THK et C : éthanethiol (13 μ g/l) + THK + lies (préparées dans les conditions décrites précédemment).

Les bouteilles sont hermétiquement bouchées et conservées à l'obscurité. On dose les composés soufrés légers après trois jours.

Les résultats présentés figure 1 montrent qu'une addition de lies fraîches issues d'un vin, à une solution modèle renfermant de l'éthanethiol, conduit à la disparition totale de ce composé.



A : THK+ lies - B : THK+ éthanethiol - C : THK+ éthanethiol+ lies

Fig. 1 — Incidence d'une addition de lies fraîches issues d'un vin sur les teneurs en composés soufrés légers d'un milieu modèle

Fig. 1 — Effect of adding wine yeast lees on light sulfur compounds in a wine-like solution

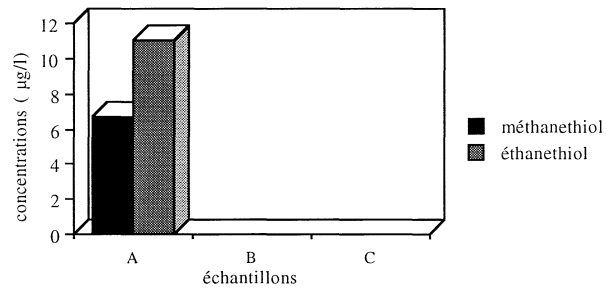
En effet, les 12 µg d'éthanethiol dosés dans l'échantillon B sont absents de l'échantillon C. En revanche, les teneurs en H₂S et disulfure de carbone, composés cédés au tampon par les lies, demeurent comparables à celles de l'échantillon témoin (A).

Or, la disparition de l'éthanethiol ne peut s'expliquer par un simple phénomène d'oxydation. En effet, si tel était le cas, l'H₂S, composé facile à éliminer, disparaîtrait également. Pour expliquer la fixation de certains mercaptans légers par les lies, on peut envisager deux hypothèses : ou bien ces composés réagissent avec certains constituants du moût fixés sur la paroi des levures, ou bien il s'agit d'une adsorption directe par les polysaccharides pariétaux. Pour vérifier cette deuxième hypothèse, nous avons utilisé non plus des lies de vin blanc, mais des levures issues de la fermentation d'un milieu modèle.

2) Adsorption des thiols volatils par des lies issues d'une culture en milieu modèle

Trois échantillons A, B et C sont préparées dans des demi-bouteilles selon les modalités suivantes : A : tampon tartrate (THK)+ éthanethiol (13 µg/l)+ méthaneethiol (7 µg/l), B : THK+ éthanethiol (13 µg/l)+ méthaneethiol (7 µg/l)+ lies, C : THK+ éthanethiol (13 µg/l)+ méthaneethiol (7 µg/l)+ lies + SO₂ (5 g/hl). Les lies utilisées proviennent d'une culture dans un milieu de composition simple. Après trois jours de conservation à l'obscurité, on dose les composés soufrés légers.

Le méthaneethiol et l'éthaneethiol présents dans l'échantillon A, témoin de l'expérience, ont disparu des deux échantillons additionnés de lies (B et C) (figure 2). Il semble donc que les parois des levures puissent adsorber directement l'éthaneethiol et le méthaneethiol, sans



A : THK+ éthanethiol+ méthaneethiol
B : THK+ éthanethiol+ méthaneethiol+ lies
C : THK+ éthanethiol+ méthaneethiol+ lies+ SO₂

Fig. 2 — Incidence d'une addition de lies issues de la fermentation d'un milieu modèle sur la teneur en méthaneethiol et éthaneethiol du milieu

Fig. 2 — Effect of adding yeast lees on methyl and ethyl mercaptans concentrations in a wine-like solution

l'intervention des constituants du moût susceptibles d'être fixés sur celles-ci, en particulier les composés phénoliques.

Ces deux expériences démontrent l'aptitude des lies à fixer certains thiols volatils sur leur paroi, en particulier le méthaneethiol et l'éthaneethiol. En revanche, l'hydrogène sulfuré et les sulfures volatils légers comme le disulfure de carbone, ne sont pas adsorbés par les lies.

II — MÉCANISMES DE FIXATION DE CERTAINS THIOLS VOLATILS DU VIN SUR LES PAROIS DE LEVURES

L'adsorption des composés soufrés volatils par les lies de levures apparaît comme un phénomène relativement sélectif, concernant seulement les mercaptans. Nous avons envisagé que le méthaneethiol et l'éthaneethiol puissent être adsorbés sur les parois des levures par formation de ponts disulfures avec le groupement SH libre des mannoprotéines. On sait en effet, que ces composés, dont la partie peptidique contient de la cystéine, constituent la couche externe de la paroi levurienne (ZLOTNIK *et al.*, 1984).

Afin de démontrer l'intervention des mannoprotéines pariétales, via la formation de ponts disulfures, dans le mécanisme de fixation de certains thiols volatils par les levures, nous avons effectué plusieurs expériences d'élimination du méthaneethiol et de l'éthaneethiol d'un milieu modèle en utilisant des parois de levures.

1) Adsorption des thiols volatils par des parois obtenues par broyage de levures entières

Nous comparons ici l'efficacité des parois et des levures entières sur la fixation du méthaneethiol et de l'éthaneethiol en milieu synthétique. Trois échantillons sont préparés dans des demi-bouteilles selon les moda-

lités suivantes : A : THK+ méthanethiol (4 µg/l)+ éthanethiol (12 µg/l) ; B : THK+ méthanethiol (4 µg/l)+ éthanethiol (12 µg/l)+ lies (3 p. cent) ; C : THK+ méthanethiol (4 µg/l)+ éthanethiol (12 µg/l) + parois (2 p. cent). Les parois sont obtenues par broyage en l'absence de réducteur. Les composés soufrés légers sont analysés après trois jours.

On constate (figure 3), que les teneurs en méthaneethiol et éthaneethiol dosées dans l'échantillon C sont identiques à celles de l'échantillon témoin (A).

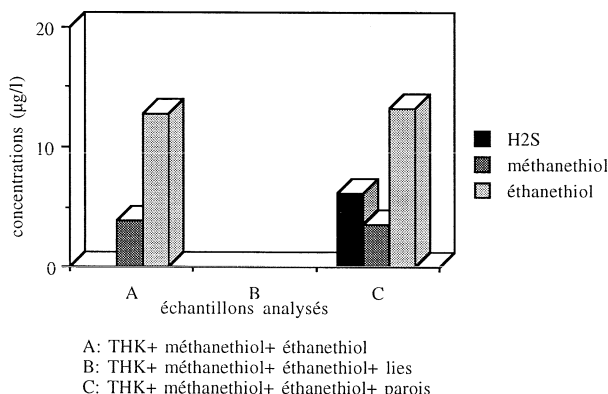


Fig. 3 — Efficacité des parois de levures obtenues par broyage sans réducteur sur les teneurs en méthaneethiol et éthaneethiol d'un milieu modèle

Fig. 3 — Efficacy of cell-walls isolated by crushing whole cells without any reducing agent, on methyl and ethyl mercaptans concentrations in a wine-like solution

En revanche, ces deux molécules sont absentes de l'échantillon additionné de levures entières (B).

Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ces résultats : ou bien, contrairement à ce que nous avons imaginé, les thiols volatils ne peuvent être adsorbés sur la paroi des levures, ou bien les parois utilisées dans notre expérience sont déjà saturées en thiols volatils. Il est possible, en effet, qu'au cours du broyage, les composés soufrés légers, et en particulier les thiols volatils contenus dans la levure, aient saturé les sites de fixation des mercaptans des parois, les rendant ainsi inaptes à éliminer le méthaneethiol et l'éthaneethiol présents dans le tampon. Afin de vérifier cette seconde hypothèse, les parois de l'échantillon C sont recueillies par centrifugation, rincées à deux reprises, puis réparties dans deux demi-bouteilles contenant du THK. On ajoute à l'un des échantillons, un réducteur puissant, le dithiothréitol (DTT), à raison de 1 mM. Après deux jours, on dose les composés soufrés légers (figure 4).

On constate dans l'échantillon additionné du réducteur la présence de quantités importantes de méthaneethiol et d'éthaneethiol. L'échantillon conservé sans DTT en est totalement dépourvu.

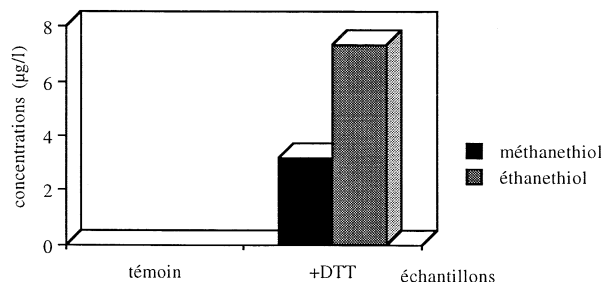


Fig. 4 — Libération des thiols adsorbés sur la paroi par addition d'un réducteur

Fig. 4 — Release of adsorbed thiols on yeast cell-walls by adding a reducing agent

Ainsi, lorsque des parois de levures, isolées par simple broyage de cellules entières préalablement cultivées sur un moût de raisin, sont soumises à l'action d'un réducteur puissant tel le DTT, elles libèrent des quantités appréciables de méthaneethiol et d'éthaneethiol. On peut penser qu'il s'agit de mercaptans endocellulaires adsorbés sur les parois lors du broyage.

2) Adsorption des thiols volatils par des parois obtenues par broyage de levures entières en présence de DTT

On prépare trois échantillons dans des demi-bouteilles : A : THK+ parois (2 p. cent en poids humide) ; B : THK+ méthaneethiol (8 µg/l)+ éthaneethiol (12 µg/l) ; C : THK+ méthaneethiol (8 µg/l)+ éthaneethiol (12 µg/l)+ parois (2 p. cent en poids humide). Les parois sont obtenues par broyage de cellules entières en présence de DTT. On dose les composés soufrés légers après trois jours (figure 5).

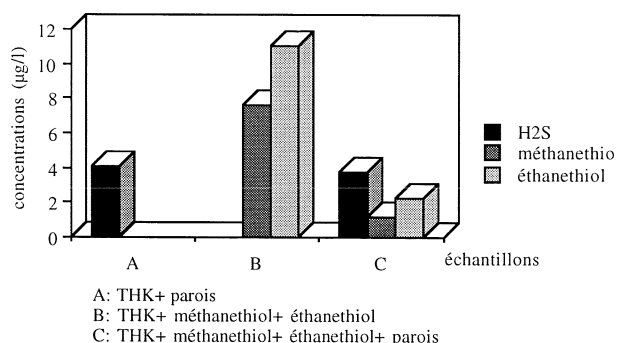


Fig. 5 — Efficacité des parois de levures sur la fixation du méthaneethiol et de l'éthaneethiol

Fig. 5 — Efficacy of yeast cell-walls on methyl and ethyl mercaptans adsorption

Les teneurs en méthaneethiol et éthaneethiol dosées dans l'échantillon C sont nettement inférieures à celles initialement ajoutées. L'hydrogène sulfuré présent dans les échantillons A et C provient des parois ajoutées malgré les rinçages répétés qu'elles ont subi. L'aptitude

des parois de levures à fixer le méthane-thiol et l'éthane-thiol est ainsi démontrée.

L'intervention de ponts disulfures dans ce phénomène est clairement mise en évidence par la libération des thiols fixés après addition de DTT (figure 6).

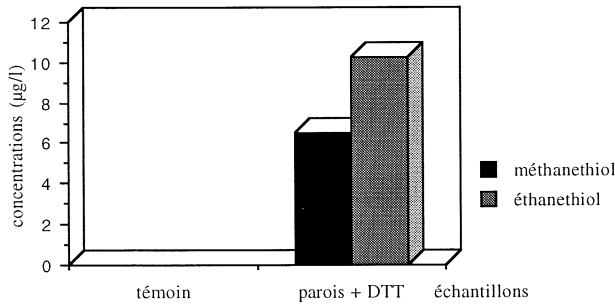


Fig. 6 — Libération du méthane-thiol et de l'éthane-thiol adsorbés sur les parois de levure par addition d'un réducteur

Fig. 6 — Release of adsorbed methyl and ethyl mercaptans on yeast cell-walls by adding a reducing agent

Le mécanisme de relibération dans le milieu du méthane-thiol ou de l'éthane-thiol adsorbé sur les parois de levure en présence de DTT est décrit à la figure 7. En présence d'un excès de DTT, le méthane-thiol, lié par des ponts disulfures à la paroi, en est libéré. Il est provisoirement remplacé par le DTT avant que celui-ci n'en soit lui-même libéré et cyclisé.

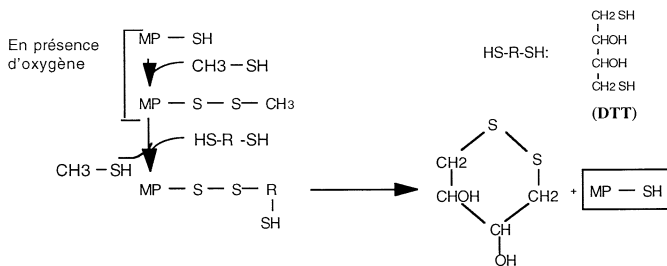


Fig. 7 — Mécanisme de libération des thiols adsorbés sur la paroi après addition de DTT

Fig. 7 — Release mechanism of adsorbed thiols on yeast cell-walls by adding a reducing agent.

Compte tenu de l'organisation moléculaire de la paroi cellulaire de la levure dont la couche externe est formée d'une association de β-(1-3)-glucane et de différentes mannoprotéines (FLEET, 1991 ; KLIS, 1994 ; STRATFORD, 1994), il est naturel d'envisager que ces dernières, par le groupement -SH libre de la cystéine qu'elles contiennent, puissent former des ponts disulfures avec l'éthane-thiol et le méthane-thiol.

Ce rôle clé des mannoprotéines dans la fixation des thiols est vérifié dans l'expérience suivante.

3) Adsorption des thiols volatils par des parois de levures ayant subi une hydrolyse par le Glucanex

On prépare quatre échantillons en demi-bouteilles : A : THK+méthane-thiol (4 µg/l)+ éthane-thiol (12 µg/l) ; B : THK+méthane-thiol (4 µg/l)+ éthane-thiol (12 µg/l)+ lies (3 p. cent) ; C : THK+ méthane-thiol (4 µg/l)+ éthane-thiol (12 µg/l)+ parois (2 p. cent) ; D : THK+ méthane-thiol (4 µg/l)+ éthane-thiol (12 µg/l)+ parois digérées (2 p. cent) par le Glucanex.

On dose les composés soufrés légers après deux jours de conservation des échantillons à l'obscurité.

Les teneurs en méthane-thiol et éthane-thiol retrouvées dans l'échantillon D contenant les parois traitées au Glucanex, sont identiques à celles du témoin (échantillon A) (figure 8).

Ainsi, les parois de levures, ayant préalablement reçu un traitement enzymatique destiné à les débarrasser de leur fraction mannoprotéique, ont perdu leur aptitude à fixer le méthane-thiol et l'éthane-thiol.

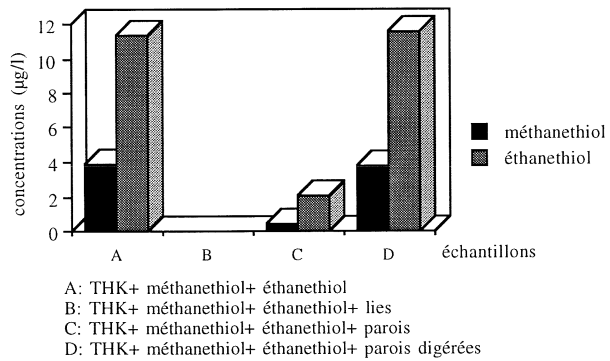


Fig. 8 — Efficacité des parois digérées au Glucanex sur la fixation du méthane-thiol et de l'éthane-thiol

Fig. 8 — Efficacy of yeast cell-walls hydrolysis by Glucanex on methyl and ethyl mercaptans adsorption

CONCLUSION

L'aptitude des lies à fixer de nombreux constituants du vin est connue depuis longtemps. D'ailleurs, le collage des vins aux lies fraîches fait partie des traitements autorisés par le Codex (Enologique). Cependant, l'incidence de cette pratique sur les défauts olfactifs de réduction, et en particulier sur leur teneur en mercaptans, n'avait pas fait l'objet d'études précises.

Nous montrons que des lies fraîches, issues d'un vin ou d'un milieu de culture fermenté, sont susceptibles, en milieu modèle de composition proche de celle du vin, de fixer l'éthane-thiol et le méthane-thiol à l'occasion d'une aération.

Cette aptitude des lies à éliminer certains thiols volatils du vin tient à la formation de ponts disulfures entre les groupements -SH libres des mannoprotéines pariétales de levure et ceux des thiols volatils.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHATONNET P., DUBOURDIEU D. et BOIDRON J.N., 1992. Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur constitution en substances cédées par le bois. *Sci. Alim.*, **12**, 665-680.
- DUBOURDIEU D., VILLETAZ J.C., DESPLANQUES C. et RIBÉREAU GAYON P., 1985. Investigations of an industrial β D-glucanase from *Trichoderma harzanium*. *Carbohydr. Res.*, **144**, 277-287.
- DUBOURDIEU D. et MOINE V., 1995. Mise au point d'une préparation industrielle extraite de la levure, améliorant la stabilité protéique et inhibant les précipitations tartriques des vins. *5^e Symp. Int. Œnol.*, 15-17 juin, Bordeaux.
- FLEET G.H., 1991. Cell Wall. In : *The Yeasts. 4. Yeasts organelles*, 199-277, Academic Press, Londres.
- KLIS F.M., 1994. Review : cell wall assembly in yeasts, *Yeast*, **10**, 851-869.
- LAVIGNE Valérie, 1995. Interprétation et prévention des défauts olfactifs de réduction lors de l'élevage sur lies totales. *Rev. Fr. Œnol.*, **155**, 36-39.
- LAVIGNE Valérie, BOIDRON J.N. et DUBOURDIEU D., 1993. Dosage des composés soufrés volatils légers dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *J. Inter. Vigne Vin*, **27**, n°1, 1-12.
- LEDOUX V., DULAU L. et DUBOURDIEU D., 1992. Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *J. Int. Vigne Vin*, **26**, 4, 239-251.
- MOINE-LEDOUX V., 1996. Recherches sur le rôle des mannoprotéines de levure vis-à-vis de la stabilisation protéique et tartrique des vins. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II*.
- STRATFORD M., 1994. Another brick in the wall ? Recent developments concerning yeast cell envelope. *Yeast*, **10**, 1741-1752.
- ZLOTNIK H., FERNANDEZ M.P., BOWERS B. and CABIB E., 1984. *Saccharomyces cerevisiae* Manno+ proteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriology*, **159**, n°3, 1018-1026.

Manuscrit reçu 20 novembre 1996 ;
accepté le 20 décembre 1996