INFLUENCE DE L'AUTOLYSE DES LEVURES APRES FERMENTATION SUR LE DÉVELOPPEMENT DE *BRETTANOMYCES/DEKKERA* DANS LE VIN

INFLUENCE OF YEAST AUTOLYSIS AFTER ALCOHOLIC FERMENTATION ON THE DEVELOPMENT OF *BRETTANOMYCES/DEKKERA* IN WINE

Michèle GUILLOUX-BENATIER, D. CHASSAGNE, H. ALEXANDRE, Claudine CHARPENTIER et M. FEUILLAT

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, B.P. 27877, 21078 Dijon cedex, France

Résumé : Le développement de *Brettanomyces* est possible dans un milieu synthétique en présence seulement de lies levuriennes en autolyse. L'addition de glucanase qui se traduit par un enrichissement très net du milieu en glucose ne permet cependant pas l'augmentation de la population formée. Leur croissance est donc possible en présence de très faibles teneurs en glucose (moins de 150 mg/l). L'autolyse en vin rouge conduit à une multiplication très importante de ces levures avec production de phénols volatils. La présence des lies semble diminuer la teneur en 4-éthyl phénol et 4-éthyl gaïacol des vins vraisemblablement par fixation de ces composés sur la paroi de levure.

Summary : *Brettanomyces*, a contaminant yeast, is relatively common in wines and mainly in red wines during barrel aging. The results presented here relate to the effects of yeast lees autolysis on the growth of *Brettanomyces*. Experiments were realised in a culture medium after alcoholic fermentation, in a hydroalcoholic wine-like solution and in a red wine. *Brettanomyces* was inoculated at low level : 10^2 cfu/ml and the growth was controlled by counting on agar appropriate medium. Yeast lees from *S. cerevisiae* were added to these media in the presence or absence of an exogenous enzymatic preparation containing pectinase and β (1→3) glucanase activities. *Brettanomyces* is able to grow in the synthetic media containing yeast lees. The addition of the glucanase preparation on yeast lees was correlated with an enhance in extracellular glucose level. This higher glucose level corresponds to the acceleration of hydrolysis of cell-wall glucans but was not correlated with a higher level of *Brettanomyces* population. This result confirms that this yeast multiply by fermenting very small quantities of glucose. In red wine the implantation of *Brettanomyces* is easy. With a low level of inoculation (10^2 cfu/ml), contaminant yeast grows rapidly to 10^6 cfu/ml (in 5 days). The presence of *S. cerevisiae* lees in red wine enhances significantly *Brettanomyces* population to 10^7 cfu/ml. During their development, these yeast produced less than 200 µg/l of 4-ethyl phenol and 4-ethyl gaïacol. Volatile phenol content in red wine containing yeast lees were 3-5 times lower. Yeast lees have probably the particular property to being able to adsorb these volatile phenols by complexion with the cell-walls.

Mots-clés : *Brettanomyces*, autolyse, vin rouge, Pinot noir

Key words : *Brettanomyces*, yeast lees, red wine, Pinot noir

INTRODUCTION

Une meilleure connaissance des microorganismes, pouvant se développer lors du vieillissement des vins, est nécessaire. En effet, il apparaît quelquefois, au sein de la flore indigène, des germes dits d'altération provoquant alors des dépréciations qualitatives du produit. Parmi ces germes, les levures *Brettanomyces/Dekkera*, présentes dans les chais, et plus particulièrement dans les récipients en bois usagés, sont très souvent responsables de l'apparition de défauts importants : production élevée d'acide acétique (LARUE *et al.*, 1991), formation d'odeurs phénolées (écurie, sueur de cheval) à partir des acides p-coumarique et férulique (CHATONNET *et al.*, 1990, 1995) et goût de souris (HERESZTYN, 1986). Pour HENICK-KLING *et al.* (2000), *Brettanomyces* est également capable de produire d'autres composés responsables d'odeurs très désagréables : l'acide isovalérique (odeur rance) et un autre composé non encore identifié à odeur de plastique. Pour ces auteurs, ces deux derniers composés sont très dominants dans les vins très contaminés par

Pour correspondance : mgb@u-bourgogne.fr

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2001, **35**, n°3, 157-164

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

les *Brettanomyces* et seraient responsables plus rapidement des déviations olfactives notées dans les vins contaminés que les phénols volatils.

Ces levures peuvent être trouvées dans les moûts et dans les vins en cours d'élaboration, mais elles sont plus couramment rencontrées dans des vins ayant terminé leur fermentation malolactique lors du vieillissement en fûts (CHATONNET *et al.*, 1993). Ce sont des levures très dangereuses, car elles sont capables d'altérer un vin avec un niveau très faible de population : quelques centaines ou quelques milliers seulement de cellules par millilitre. Paradoxalement, peu de travaux concernant les besoins nutritionnels de *Brettanomyces* ou les paramètres physico-chimiques favorisant leur développement ont été réalisés. Pour CHATONNET *et al.* (1995), ces levures peuvent se multiplier en fermentant des teneurs en sucres très faibles de l'ordre de 200 à 300 mg/l (glucose, fructose, galactose et/ou tréhalose). De plus, les *Brettanomyces* s'adaptent parfaitement aux conditions de pH rencontrées en vinification : seuls un pH de 2,5 et une absence totale d'oxygène inhibent notablement la vitesse de croissance de ces levures (GILIS *et al.*, 1999). Pour ces auteurs, l'aération active considérablement la croissance et l'utilisation des sources carbonées du milieu (glucose, puis fructose et enfin éthanol). Une teneur en dioxyde de soufre libre, de l'ordre de 20 mg/l dans des vins de pH de 3,6-3,7, permet cependant une bonne protection du produit vis-à-vis de *Brettanomyces* (CHATONNET *et al.*, 1999).

Les pratiques traditionnelles telles que l'élevage sur lies des vins blancs et la conservation des vins rouges sur lies fines après un simple soutirage en fin de fermentation alcoolique, avec parfois micro-oxygénation, pourraient favoriser la croissance de ces levures d'altération. En effet, au cours de cet élevage, se produit l'autolyse des levures. En conditions œnologiques, la protéase A joue un rôle primordial qui se traduit par une augmentation des différentes formes d'azote dans le milieu extracellulaire (acides aminés libres et surtout peptides). Cette libération de composés azotés est de plus facilitée par la dégradation enzymatique des constituants de la paroi sous l'action des β (1→3) glucanases levuriennes. Des polysaccharides solubles (fragments de glucanes et mannoprotéines) sont ainsi retrouvés dans le vin (CHARPENTIER *et al.* 1986 ; FEUILLAT *et al.* 1989). Compte tenu du rôle important de ces macromolécules d'origine pariétale en œnologie : interactions avec les composés d'arôme (LUBBERS *et al.* 1994), participation à la notion de gras et de charnu des vins (FERRARI et FEUILLAT, 1988), rôle de protection vis-à-vis des précipitations tartriques (LUBBERS *et al.* 1993 ; MOINE-LEDOUX *et al.*, 1997) et vis-à-vis de la casse protéique (WATERS *et al.*, 1993), il peut s'avérer intéressant d'augmenter leur concentration par intensification des phénomènes d'autolyse, grâce à des glucanases exogènes. Or, ces enzymes apparaissent capables d'hydrolyser les glucanes en monomères (GUILLOUX-BENATIER *et al.*, 1999). Une étude récente réalisée par GERBAUX *et al.* (2000) montre que la présence de *Brettanomyces* dans les vins rouges de Bourgogne issus de Pinot noir n'est pas un phénomène rare. Pour ces auteurs, cependant, les teneurs en phénols volatils des vins sont très souvent inférieures au seuil de détection, vraisemblablement en raison de concentrations faibles en précurseurs.

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence de différents milieux d'autolyse (en milieu synthétique modèle ou en milieu vin) sur le développement de *Brettanomyces/Dekkera*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MICROORGANISMES ET MATÉRIEL BIOLOGIQUE UTILISÉS

Les lies levuriennes utilisées pour les autolyses ont été obtenues après fermentation alcooolique de milieu modèle ou de moût de raisin Chardonnay ensemencé avec une levure appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*, commercialisée sous le nom de Levuline BRG.

Une souche de *Dekkera bruxellensis* : souche de collection CBS 73 et une souche de *Brettanomyces bruxellensis* : 23 B4 fournie par l'Institut Technique de la Vigne et du Vin de Beaune ont été utilisées.

La préparation enzymatique utilisée est Vinoflow G® fournie par la société Novo Nordisk (Dittingen, CH) à forte activité β (1→3) glucanasique (GUILLOUX-BENATIER *et al.*, 1999). Dans toutes les expérimentations, la dose d'utilisation retenue est de 50 mg/l.

II - MILIEUX DE CULTURE ET D'AUTOLYSE

La fermentation alcoolique a été réalisée, après ensemencement à raison de 10^6 levures/ml de *S. cerevisiae*, sur un milieu synthétique défini par LANARIDIS (1984) qui contient des sucres, des acides organiques, des sels minéraux, des composés azotés et des vitamines à des concentrations voisines de celles rencontrées dans le moût de raisin. Cette levure est précultivée sur ce milieu moût modèle. Le dénombrement de la souche de collection CBS 73 (*Dekkera bruxellensis*) a été réalisé sur un milieu de culture spécifique riche en saccharose et tréhalose, milieu DSHA, décrit par CHATONNET *et al.* (1992), celui de la souche 23 B4 (*Brettanomyces bruxellensis*) sur un milieu sélectif défini par l'ITV (GERBAUX *et al.*, 2000). Pour ces

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

deux milieux de culture, la lecture des boîtes de Petri s'effectue après 2 à 3 semaines d'incubation à 30°C.

Trois milieux d'autolyse différents ont été réalisés - un tampon hydroalcoolique de composition suivante : éthanol, 10 % (v/v) ; acide DL-malique, 4 g/l ; acide acétique, 3 g/l ; K_2SO_4, 0,1 g/l ; $MgSO_4$, 7 H_2O, 25 mg/l, ajusté à pH 3,5 avec KOH 5M - un milieu de culture fermenté (milieu moût modèle) et - un vin rouge de Pinot noir provenant du Centre Expérimental et Viticole de Marsannay-la-Côte de l'Université de Bourgogne (pH 3,8, éthanol 12,5 % (v/v), 50 mg/l de SO_2 total).

III - ANALYSE DES CONSTITUANTS DU MILIEU

L'azote total est dosé par la méthode Kjeldahl et l'azote aminé par la méthode colorimétrique au dinitrofluorobenzène après établissement d'une courbe étalon avec la leucine (GHUYSEN *et al.*, 1966). Les acides aminés sont dosés par CLHP selon le système Waters™. Ils subissent tout d'abord une dérivation précolonne réalisée de la manière suivante : 70 µl de tampon borate 0,2 M, 10 µl d'échantillon convenablement dilué et contenant le standard interne (acide α-aminobutyrique, 2,5 mM), 20 µl du réactif AQC Waters (6-amino-quinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate) sont placés 10 min à 55°C. Les échantillons ainsi dérivés sont injectés en CLHP sur une colonne AccQTAG C18 (3,9 x 150 mm, taille des particules : 4 µm) thermostatée à 37 °C. La pré-colonne a les mêmes caractéristiques avec 20 mm de longueur. L'éluant A est un tampon acétate de sodium pH 5,8, l'éluant B de l'acétonitrile et l'éluant C de l'eau MilliQ. Le débit est fixé à 1 ml/min. L'élution débute par 100 % de l'éluant A, puis le taux d'éluant B augmente linéairement jusqu'à 14 % sous 35 min et reste ainsi pendant 16 min. L'élution se termine ensuite avec 60 % de l'éluant B et 40 % de l'éluant C. La concentration de chaque acide aminé, détecté par fluorescence, est déterminée par comparaison avec un étalonnage standard.

Les sucres totaux sont dosés par la méthode colorimétrique utilisant l'acide 3,5-dinitrosalicylique (BRUNER, 1964) et le glucose et fructose par méthode enzymatique (Kit Diffchamb, Lyon, France).

Les phénols volatils (éthylphénols) : 4-éthyl phénol et 4-éthyl gaïacol ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode décrite par CHATONNET *et al.* (1990).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I - DÉVELOPPEMENT DE *DEKKERA* EN PRÉSENCE DE LIES LEVURIENNES EN MILIEU SYNTHÉTIQUE

Un premier essai a été réalisé sur le milieu moût modèle précédemment décrit. Après fermentation alcoolique de ce milieu par Levuline BRG, les levures sont récupérées par centrifugation (5 000 g, 4°C, 15 min) afin de pouvoir réaliser l'autolyse dans ce milieu fermenté avec une augmentation du taux de lies d'un facteur 5. Deux lots ont été ainsi constitués : un premier lot sans glucanase et un deuxième lot additionné de glucanase à raison de 50 mg/l. L'autolyse est conduite à 20 °C pendant 32 jours sur les deux lots. L'ensemencement en *Dekkera* est effectué 7 jours après le début de l'autolyse à raison de 100 cfu/ml. L'addition d'une préparation enzymatique de β (1→3) glucanase à des lies levuriennes conduit très nettement, après 7 jours d'autolyse, à un enrichissement du milieu en glucose (figure 1). En effet, la concentration en glucose est vingt fois plus importante en présence de glucanase exogène. On note une réelle multiplication de *Dekkera* dans les deux milieux qui conduit à des populations de l'ordre de 10^7 cfu/ml en 25 jours (figure 2). Cette croissance s'accompagne de la consommation du glucose et conduit à la quasi-disparition de ce dernier dans les deux milieux. La concentration en glucose nettement plus élevée dans le lot additionné de glucanase au moment de l'ensemencement en *Dekkera* ne conduit cependant pas à une population supérieure en levures.

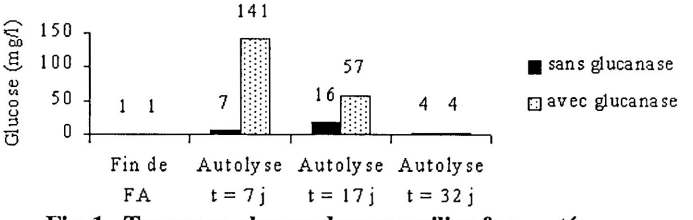


Fig. 1 - Teneur en glucose dans un milieu fermenté conservé sur lies avec et sans addition de glucanase et ensemencé par *Dekkera* à t = 7 jours

Glucose content in a fermented medium kept on yeast lees, with and without glucanase, and inoculated with *Dekkera* at t = 7 days

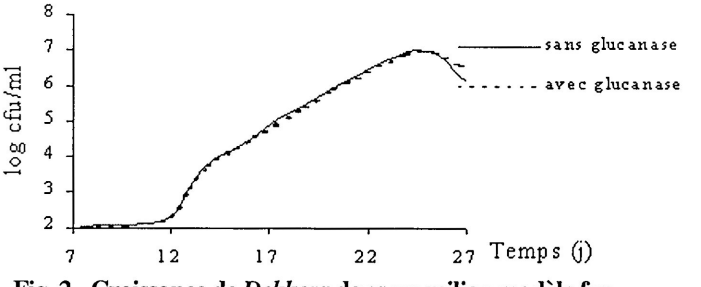


Fig. 2 - Croissance de *Dekkera* dans un milieu modèle fermenté conservé sur lies additionné ou non de glucanase

Growth of *Dekkera* in a fermented medium kept on yeast lees with and without glucanase

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2001, **35**, n°3, 157-164
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

Un deuxième essai a été conduit dans les mêmes conditions, mais les levures en fin de fermentation alcoolique sont séparées du moût modèle fermenté et mises alors en autolyse dans un tampon hydro-alcoolique exempt de toute source carbonée, azotée et vitaminique. L'autolyse se traduit par un enrichissement continu en glucose et en azote aminé dans le tampon hydro-alcoolique, enrichissement cependant plus important dans le lot additionné de glucanase (figure 3). Les concentrations en glucose et azote aminé sont cependant très faibles au moment de l'ensemencement des *Dekkera* (t = 7 jours d'autolyse) : moins de 5 mg/l en glucose et environ 150 mg/l en azote aminé. Dans les deux lots, *Dekkera* arrive cependant à se multiplier, grâce aux seuls produits d'autolyse. En effet, la population passe de 10^2 cfu/ml à environ 10^4 cfu/ml en 25 jours (figure 4). Dans cet essai également, aucune différence significative de croissance n'est observée entre les deux lots avec ou sans glucanase. Le glucose n'apparaît donc pas être un facteur limitant.

Un troisième essai est réalisé de la manière suivante : après fermentation alcoolique du milieu synthétique par Levuline BRG, les levures sont conservées dans le milieu fermenté et une autolyse est conduite à 20 °C pendant 7 jours après addition de glucanase. Les lies sont ensuite éliminées par centrifugation et *Dekkera* est alors inoculée dans ce milieu à raison de 100 cfu/ml. Une première croissance de *Dekkera* très faible est observée dans les tout premiers jours corrélée à l'utilisation partielle des sucres totaux et de l'azote aminé (tableau I). La population tend ensuite à diminuer régulièrement jusqu'au 10e jour pour atteindre des populations vivantes très faibles de l'ordre de 40 cfu/ml. Dans ce milieu, non conservée sur lies, le seul enrichissement possible en éléments nutritifs ne peut provenir que des *Dekkera* elles-mêmes. Suite à leur mortalité, ces levures s'autolysent vraisemblablement puisque les teneurs en glucose, en sucres totaux et en azote aminé tendent à augmenter régulièrement dans le milieu extracellulaire. La seule autolyse des *Dekkera* entraîne une nouvelle multiplication de ces levures puisque la population vivante dénombrée augmente significativement après le 15e jour pour atteindre 10^4 cfu/ml en fin d'expérimentation. Cette deuxième croissance levurienne se traduit alors par une diminution des concentrations en sucres totaux et en glucose du milieu extracellulaire à partir du 16e jour (baisses respectives de 19 p. cent pour les sucres totaux et de 66 p. cent pour le glucose). Ce phénomène est tout à fait comparable au comportement des levures à voile du vin jaune qui se remultiplient suite à leur propre autolyse (DOS SANTOS, 2000).

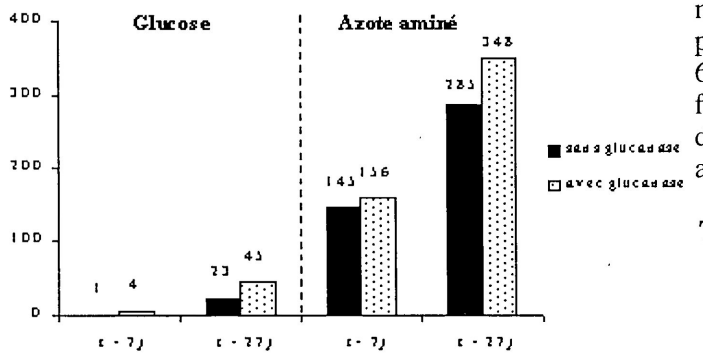


Fig. 3 - Teneurs en glucose (mg/l) et en azote aminé (mg Leu/l) libérées dans un tampon hydroalcoolique conservé sur lies avec et sans addition de glucanase et ensemencé par *Dekkera* à t = 7 jours

Glucose (mg/l) and amino nitrogen contents (mg Leu/l) in a model wine kept on yeast lees, with and without glucanase, and inoculated with *Dekkera* at t = 7 days

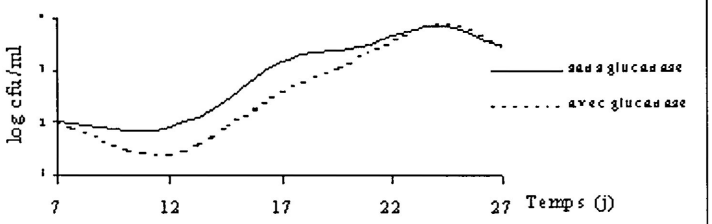


Fig. 4 - Croissance de *Dekkera* dans un tampon hydroalcoolique conservé sur lies additionné ou non de glucanase

Growth of *Dekkera* in a model wine kept on yeast lees with and without glucanase

Tableau I - Évolution de la population de *Dekkera* et des teneurs en sucres totaux, en glucose et en azote aminé dans un milieu synthétique ayant subi une autolyse de 7 jours

Evolution of *Dekkera* populations, residuals sugars, glucose and amino nitrogen contents in a synthetic medium after 7 days of yeast autolysis

Temps (j)	Dekkera (cfu/ml)	Sucres totaux (mg glucose/l)	Glucose (mg/l)	Azote aminé (mg Leu/l)
0	100	543	17	60
1	4 000	412	23	38
2	3 000	504	38	42
3	1 500	-	46	-
5	170	547	73	42
9	50	576	121	52
10	40	-	128	-
11	40	585	144	65
12	100	642	153	62
15	500	661	173	65
16	1 400	691	188	61
17	2 500	679	189	68
18	4 800	631	187	65
19	10 000	560	64	61

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

II - DÉVELOPPEMENT DE *BRETTANOMYCES* EN PRÉSENCE DE LIES LEVURIENNES EN MILIEU VIN

Un vin rouge de Pinot noir, fermenté par Levuline BRG, est séparé en deux lots. Ceux-ci sont conservés sur lies pendant 20 jours à 30 °C en vue de favoriser l'autolyse, mais l'un des deux lots est additionné de glucanase à la dose de 50 mg/l. La libération du glucose et de l'azote aminé est suivie au cours du temps (tableau II). Une augmentation significative des teneurs en azote aminé et en glucose est observée dans le milieu vin suite à l'autolyse des levures pendant les 6 premiers jours d'autolyse. La libération du glucose et de l'azote aminé se poursuit ensuite, mais beaucoup plus faiblement. La présence de glucanase dans le vin rouge ne modifie pas les teneurs en azote aminé et en glucose du vin rouge.

Après 20 jours d'autolyse, ces deux lots sont à nouveau séparés en deux avec ou sans conservation sur lies. Les 4 lots ainsi obtenus sont alors ensemencés en *Brettanomyces* à la dose de 100 cfu/ml. Le suivi de la croissance de *Brettanomyces* dans les différents lots est donné figure 5. Ce vin rouge dans lequel s'est déroulée une autolyse des levures apparaît très favorable à la croissance des *Brettanomyces*. Aucune phase de latence n'est notée et la population maximale est obtenue pour tous les lots après seulement 5 jours de culture. Les niveaux de populations sont élevés puisqu'ils atteignent des taux de l'ordre de 10^6 à 10^7 cfu/ml. La présence des lies dans deux des lots permet cependant une croissance supérieure d'environ un facteur 10 à celle notée dans les deux lots séparés de leurs lies. Cette plus forte croissance est sans doute due à la poursuite de l'autolyse des levures dans ces lots renfermant des lies. Il y a ainsi un enrichissement continu du vin en éléments nutritifs stimulant la croissance de *Brettanomyces*.

Tableau II - Libération de l'azote aminé et du glucose au cours de l'autolyse des lies d'un vin rouge avec ou sans glucanase

Evolution of amino nitrogen and glucose contents during yeast lees autolysis with and without glucanase in a red wine

	Autolyse sans glucanase		Autolyse avec glucanase	
Temps (j)	Azote aminé (mg Leu/ml)	Glucose (mg/l)	Azote aminé (mg Leu/ml)	Glucose (mg/l)
0	174	336	179	345
4	205	805	199	774
6	208	829	206	843
11	207	902	204	908
15	200	906	200	984
20	196	910	197	966

Les teneurs en acides aminés et en glucose des vins avant et après développement des *Brettanomyces* sont données dans le tableau III. Les quatre lots pendant la croissance de ces levures voient leurs teneurs en acides aminés totaux rester sensiblement constantes. La consommation en acides aminés par les *Brettanomyces* est vraisemblablement très faible et l'apport par autolyse dans le cas des lots avec lies est négligeable. Les teneurs en glucose dans ces deux lots diminuent, respectivement de 910 à 570 mg/l et de 966 à 510 mg/l. Le lot non conservé sur lies et ayant subi une autolyse sans la présence de glucanase exogène voit sa teneur en glucose diminuer très fortement (de 910 mg/l à 39 mg/l) après la multiplication de *Brettanomyces*. Par contre, le lot non conservé sur lies, mais qui a subi une autolyse en présence de glucanase exogène voit sa teneur en glucose diminuer beaucoup moins fortement (de 966 à 500 mg/l). Ces résultats peuvent s'expliquer pour les deux lots conservés sur lies par la poursuite de l'autolyse des constituants pariétaux des levures qui masque ainsi les consommations de glucose par les *Brettanomyces*.

Dans le lot conservé sans lies en présence de glucanase, les résultats obtenus pourraient s'expliquer par la poursuite de l'action de la glucanase sur les fragments pariétaux ayant été préalablement libérés lors de l'autolyse de 20 jours.

Les teneurs en 4-éthyl phénol et en 4-éthyl gaïacol ont été dosées dans les 4 lots de vin rouge avant et après croissance de *Brettanomyces*. Avant l'inoculation levurienne, les phénols volatils sont présents, mais à l'état de traces non quantifiables. Par contre, la croissance de *Brettanomyces* se traduit effectivement par une aug-

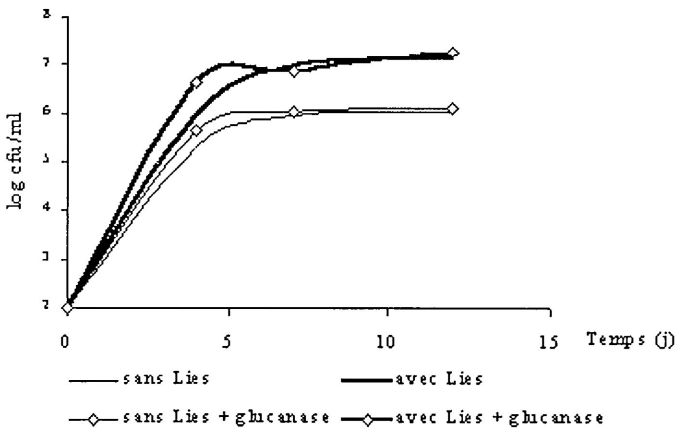


Fig. 5 - Croissance de *Brettanomyces* dans un vin rouge ayant subi une autolyse de 20 jours avec ou sans glucanase et conservé après ces 20 jours avec ou sans lies

Growth of *Brettanomyces* in a red wine after 20 days of autolysis with and without glucanase and kept after these 20 days with and without yeast lees

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2001, **35**, n°3, 157-164
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

mentation très significative dans les 4 lots de 4-éthyl gaïacol et surtout de 4-éthyl phénol (figure 6). Les quantités de 4-éthyl phénol formées restent cependant faibles, puisque les concentrations obtenues sont inférieures à 200 µg/l. Elles sont donc largement inférieures aux doses reconnues responsables des odeurs phénolées déterminées dans les vins rouges de Bordeaux par CHATONNET *et al.* (1990), à savoir supérieures à 450 µg/l d'éthyl-phénols (4-éthyl phénol et 4-éthyl gaïacol dans un rapport de 8 pour 1).

Cependant un résultat très intéressant apparaît. Les vins rouges conservés sur lies pendant la multiplication des *Brettanomyces* et qui ont par ailleurs permis la plus forte multiplication levurienne ont des teneurs en phénols volatils très largement inférieures à celles déterminées dans les vins conservés sans lies. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'adsorption possible des phénols volatils formés sur les parois levuriennes. Des observations semblables ont été faites par LAVIGNE et DUBOURDIEU (1996) concernant la fixation sur les mannoprotéines levuriennes de certains composés soufrés volatils tels que l'éthanethiol et le méthanethiol.

CONCLUSION

Parmi les germes de contamination possible, les *Brettanomyces/Dekkera* s'avèrent effectivement potentiellement très dangereuses en œnologie. En effet, nous confirmons, dans cette étude, la capacité de ces levures à se multiplier en présence de très faibles concentrations en sucres réducteurs. Ainsi, une autolyse courte (de 7 jours seulement) de levures de vinification appartenant à l'espèce *S. cerevisiae*, réalisée dans un tampon hydroalcoolique, exempt de toute source azotée, vitaminique ou glucidique, permet une multiplication de *Dekkera* jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10^4 cfu/ml. L'addition de glucanase exogène dans les milieux modèles, en vue de favoriser l'autolyse des levures, enrichit certes les milieux extracellulaires en glucose, mais ne conduit cependant pas à une plus forte

Tableau III - Influence du développement de *Brettanomyces* sur les teneurs en acides aminés libres (mg N/l) et en glucose (mg/l) d'un vin rouge ayant subi une autolyse de 20 jours avec ou sans glucanase et conservé ensuite avec et sans lies

Effect of *Brettanomyces* development on free amino acids (mg N/l) and on glucose (mg/l) contents in the red wine after 20 days of autolysis with and without glucanase and kept after these 20 days with and without yeast lees

Acides aminés	Autolyse sans glucanase				Autolyse avec glucanase			
	conservé sans lies		conservé avec lies		conservé sans lies		conservé avec lies	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
ASP	3,2	3,5	3,2	3,3	3,4	3,4	3,4	3,3
GLU	8,3	8,6	8,3	8,1	8,6	8,5	8,6	8,4
SER	2,8	1,8	2,8	2,7	2,8	2,5	2,8	2,6
ASN	5,8	6,2	5,8	6,2	5,8	6,3	5,8	6,3
GLY	5,0	4,8	5,0	5,2	5,0	5,4	5,0	5,4
GLN	3,1	3,5	3,1	2,8	3,0	3,0	3,0	1,5
HIS	5,5	5,3	5,5	6,2	5,8	6,7	5,8	6,5
THR	3,2	3,1	3,2	3,5	3,4	3,6	3,4	3,5
ARG	6,4	4,4	6,4	6,9	6,8	6,2	6,8	6,7
ALA	17,9	16,4	17,9	18,9	17,9	17,8	17,9	17,2
GABA	7,1	6,3	7,1	7,1	6,9	6,4	6,9	6,2
PRO	89,1	84,9	89,1	90,8	88,8	91,0	88,8	92,3
TYR	0,4	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6
CYS	0,3	1,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5
VAL	2,9	2,9	2,9	3,0	2,9	2,9	2,9	3,0
MET	1,1	0,8	1,1	0,8	1,1	0,9	1,1	1,1
ILEU	1,1	1,2	1,1	1,2	1,3	1,3	1,3	1,2
LEU	2,7	2,7	2,7	2,8	2,8	2,7	2,8	2,8
LYS	9,1	8,2	9,1	8,4	9,7	9,1	9,7	8,7
PHE	1,9	1,9	1,9	2,1	2,0	2,2	2,0	2,4
Total	177,1	168,1	177,1	180,9	178,7	180,6	178,7	180,2
Glucose	910	39	910	570	966	500	966	510

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

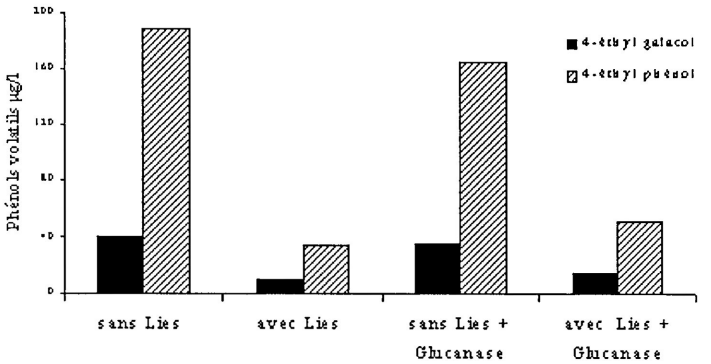


Fig. 6 - Teneur en phénols volatils des vins rouges après la croissance de *Brettanomyces*

Volatile phenols content of the red wines after growth of *Brettanomyces*

croissance de *Dekkera*. Dans les conditions de l'élevage sur lies avec autolyse, le glucose n'est pas un facteur limitant.

En milieu vin rouge de Pinot noir, l'autolyse levurienne permet un très net enrichissement du milieu extracellulaire en composés azotés (acides aminés) et en glucose. Ceci conduit alors à un milieu très favorable au développement de *Brettanomyces,* puisque des populations de l'ordre de 10^6 cfu/ml sont obtenues 5 jours seulement après leur inoculation. Les lots de vins rouges ensemencés en *Brettanomyces* et toujours conservés sur lies apparaissent encore plus favorables pour la croissance de cette levure : des populations de l'ordre de 10^7 cfu/ml sont en effet dénombrées. Or, l'élevage sur lies fines des vins rouges est de plus en plus pratiqué. Cette technique d'après les expérimentateurs (FEUILLAT *et al.*, 1999) présente un intérêt vis-à-vis des caractères organoleptiques des vins : tanins moins astringents et meilleure stabilité de la couleur. Toutefois, ce travail montre le risque avec cette pratique de la très grande facilité de multiplication des *Brettanomyces* avec production de phénols volatils. Ceux-ci restent cependant en-dessous de leur seuil de perception (teneurs inférieures à 200 µg/l) d'autant que la présence des lies semble diminuer la teneur en 4-éthyl phénol et 4-éthyl gaïacol de ces vins, vraisemblablement par fixation sur les parois levuriennes. Nous cherchons actuellement à préciser le phénomène pour connaître le risque réel d'altérations sensorielles des vins rouges élevés sur lies fines.

Remerciements : Nous remercions A. COTTET, V. DUBOIS, étudiants à l'IUVV et J. GUERREAU, assistant-ingénieur, pour leur participation à cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BRUNER R.L., 1964. Determination of reducing value 3,5-dinitrosalicylic acid method. *Chem. Anal.*, **19**, 67-71.

CHATONNET P., BOIDRON J.-N. et PONS M., 1990. Élevage des vins rouges en fûts de chêne : évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sci. Alim.*, **10**, 565-587.

CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.-N. et PONS M.,1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.*, **60**, 165-178.

CHATONNET P., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1993. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en éthyl-phénols. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **27**, 277-298.

CHATONNET P., DUBOURDIEU D. et BOIDRON J.-N.,1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 463-468.

CHATONNET P., MASNEUF I., GUBBIOTTI M.C. et DUBOURDIEU D.,1999. Prévention et détection des contaminations par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage des vins. *Rev. Fr. Œnologie*, **179**, 20-24.

CHARPENTIER C., N'GUYEN VAN LONG T., BONALY R. et FEUILLAT M., 1986. Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 405-413.

DOS SANTOS A.M., 2000. Recherche de composés marqueurs du vieillissement des vins jaunes. *Thèse Doctorat*, Université de Bourgogne.

LAVIGNE V. et DUBOURDIEU D., 1996. Mise en évidence et interprétation de l'aptitude des lies à éliminer certains thiols volatils du vin. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **30**, 201-206.

FERRARI G. et FEUILLAT M., 1988. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne I. Étude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. *Vitis*, **27**, 183-197.

FEUILLAT M., FREYSSINET M. et CHARPENTIER C., 1989. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne II. Évolution des macromolécules : polysaccharides et protéines. *Vitis*, **28**, 161-176.

FEUILLAT M., ESCOT S., DULAU L. et CHARPENTIER C., 1999. Élevage des vins rouges sur lies fines – Intérêt des interactions entre polysaccharides de levures et polyphénols du vin. *Rev. Œnol.*, **98**, 1-2.

GERBAUX V., JEUDY S. et MONAMY C., 2000. Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bull. O.I.V.*, 835-836, 581-599.

GILIS J.F., SEILLER I. et DELIA M.L., 1999. Effets de certains paramètres physico-chimiques (pH et O_2) sur la cinétique de croissance de *Brettanomyces. In : 6e Symp. Int. Œnol.*, Bordeaux. Tec & Doc ed, Paris, p. 264-267.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

GHUYSEN J.M., TIPPER D.J.et STROMINGER J.L., 1966. Enzymes that degrade bacteria cell wall. *Method. Enzymol.*, **8**, 685-699.

GUILLOUX-BENATIER M., PUECH B. et FEUILLAT M., 1999. Incidence d'une activité glucanasique exogène sur le devenir des macromolécules levuriennes du vin. *Vitis*, **38**, 133-137.

HENICK-KLING T., EGLI C., LICKER J., MITRAKUL C. et ACREE T.E., 2000. *Brettanomyces* in Wine. *In: Proceedings 5th Int. Symp. Cool Climate*. Melbourne, Australia.

HERESZTYN T., 1986. Metabolism of phenolic compound from hydroxycinnamic acid by *Brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 46-49.

LANARIDIS P., 1984. Recherches sur quelques aspects microbiologiques de la vinification. *Thèse Doctorat*, Université de Bordeaux II.

LAVIGNE V. et DUBOURDIEU D., 1996. Mise en évidence et interprétation de l'aptitude des lies à éliminer certains thiols volatils du vin. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **30**, 201-206.

LARUE F., ROZES N., FROUDIERE I., COUTY C. et PERREIRA G.P., 1991. Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **25**, 149-165.

LUBBERS S., FEUILLAT M. et CHARPENTIER C., 1994. Influence of mannoproteins from yeast on the aroma intensity of a model wine. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **27**, 108-114.

LUBBERS S., LEGER B., CHARPENTIER C. et FEUILLAT M., 1993. Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **27**, 13-22.

MOINE-LEDOUX V., PERRIN A., PALADIN I. et DUBOURDIEU D., 1997. Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de mannoprotéines purifiées (Mannostab™). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **31**, 23-31.

WATERS E.J., WALLACE W., TATE M.E. et WILLIAMS P.J., 1993. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 724-730.

manuscrit recu le 5 avril 2001 ;
accepté pour publication le 29 juin 2001

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)