ÉTUDE DE CINQ SOUCHES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PAR RAPPORT À LEUR MÉTABOLISME DU GÉRANIOL

STUDY OF FIVE STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WITH REGARD TO THEIR METABOLISM TOWARDS GERANIOL

Emilia GARCIA MORUNO[1], Monica RIBALDONE[1], R. DI STEFANO[1 et *], Lorenza CONTERNO[2], Annibale GANDINI[2]

1 : Istituto Sperimentale per l'Enologia, via Pietro Micca 35, 14100 Asti (Italie)
2 : Di.Va.P.R.A.-Microbiologia e Industrie agrarie, Università di Torino, via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Italie)

Résumé : La formation du citronellol à partir du géraniol, au cours de la fermentation d'un moût de raisin neutre enrichi par du géraniol, par différentes souches de levures, a été étudiée. On a additionné au moût deux quantités de géraniol pour évaluer une éventuelle influence de la concentration initiale du terpénol sur la vitesse de la transformation effectuée par la levure. Nous avons enregistré que la quantité de citronellol formée dépend de la souche de levure utilisée, surtout quand la concentration initiale de géraniol est élevée. Le contenu en acides gras insaturés du moût semble influencer la teneur en citronellol à la fin de la fermentation alcoolique.

Abstract: Geraniol is the main monoterpenic alcohol of some red grapes occurring both in the free form (aromatic) and in the glycosilated (neutral) form. Free geraniol is transformed into other terpenic compounds (linalool and α-terpineol) through acid hydrolysis. During fermentation, yeasts also change must free geraniol into citronellol. The final aroma of wines is mainly due to both the unchanged geraniol and the formed citronellol, thus the key role played by yeasts in the vinification of those aromatic wines is proved. In the present work the metabolism towards geraniol of 5 different strains of *S. cerevisiae* were studied. The laboratory tests were carried out using a must from neutral grapes as the fermentation medium. Two different amounts of geraniol were added to the medium to evaluate the influence, if any, of the initial concentration of monoterpenic alcohol on the transformation rate of this compound. At different stages of fermentation geraniol and citronellol, as well as other terpenic compounds, were evaluated by means of GC on samples extracted by SPE on a C18 cartridge.
The results proved that the yeast strain dramatically affects the amount of both geraniol and citronellol occurring in the medium at the end of fermentation. Therefore in the fermentation of aromatic musts in which geraniol is the main component, the choice of the yeast proves decisive for the quality of wines.
The influence of tween 80, added to the medium as a source of oleic acid, on the biosynthesis of citronellol was evaluated as well. The results showed that tween 80 increases the production of citronellol, though no remarkable changes in the consumption of geraniol were observed. It can therefore be concluded that the production of citronellol by yeasts is a minor way of utilizing geraniol when no longer needed for the synthesis of cell fats.

Mots clés : géraniol, citronellol, levure, vin.

Key words: geraniol, citronellol, yeast, wine.

INTRODUCTION

Le géraniol, du point de vue quantitatif, est le principal alcool monoterpénique de certains cépages rouges aromatiques, comme les «Malvasies» à baie colorée du Piémont et le «Brachetto d'Acqui» (DI STEFANO et CORINO, 1984).

Il se trouve dans les pellicules et dans la pulpe de ces raisins. Il est présent , soit sous la forme libre aromatique, soit sous la forme glycosylée non aromatique. La forme glycosylée est prédominante. Pendant la fermentation, une partie du géraniol libre, présent dans le moût débourbé, est transformée en citronellol sous l'action des levures (GRAMATICA *et al*., 1982; DI STEFANO *et al*., 1992 ; DUGELAY *et al*., 1992). Il est aussi transformé en d'autres composés terpéniques (linalol et α-terpinéol) par hydrolyse en milieu acide (DI STEFANO, 1987; SKOUROUMOUNIS et SEFTON, 2000). L'arôme final du vin est surtout caractérisé par le géraniol non transformé et par le citronellol produit, c'est-à-dire les deux alcools monoterpéniques présents en plus forte concentration.

*Correspondance : sezione.chimica@tin.it

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2002, **36**, n°4, 221-225

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

Dans la préparation de ce type de vin, on cherche donc à obtenir un moût le plus riche possible en géraniol, pour avoir un vin avec une teneur suffisante en géraniol et citronellol. On peut réaliser cet objectif en augmentant la quantité de géraniol libre présent dans le moût, en utilisant une technique de vinification qui favorise l'hydrolyse des glycosides terpéniques de la pellicule du raisin (GARCIA MORUNO *et al*., 2000), ou en cherchant à obtenir un haut rendement en citronellol, pendant la fermentation. Dans ce dernier cas, le rôle de la levure est particulièrement important.

L'incidence de la souche de levure sur la révélation du potentiel aromatique d'autres cépages a été étudiée par DELTEIL *et al*. (1999) et COLAS *et al*. (1999).

Dans cette recherche, on a étudié le comportement au laboratoire de cinq souches de levure pendant la fermentation d'un moût de raisin neutre enrichi en géraniol. On a additionné au moût deux quantités de géraniol, respectivement une faible quantité et une forte quantité, pour évaluer une éventuelle influence de la concentration initiale du terpénol sur la vitesse de la transformation effectuée par la levure.

On a étudié aussi l'influence de l'addition au milieu du Tween 80 sur la biosynthèse du citronellol par la levure.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - LEVURES

On a utilisé quatre souches de *S. cerevisiae* de la collection de la section de Microbiologie du Di.Va.P.R.A (Turin, Italie) et une levure commerciale (Zymaflore VL-1, Laffort, France) utilisée normalement dans la vinification du Brachetto : IMIAT 478, IMIAT 409, IMIAT 432, IMIAT 170, VL-1.

II - FERMENTATIONS

On a réalisé les fermentations à pH = 3,3 et à la température de 18 °C. Comme milieu de fermentation, on a utilisé un moût de raisin (Biotta, AG, CH-8274), sans composés terpéniques libres. Pour chaque souche de levure, on a préparé quatre litres de milieu de fermentation qui ont été stérilisés et divisés en deux lots de deux litres. A chacun des lots, on a ajouté une quantité de géraniol pour obtenir des concentrations d'environ 200 et 1 000 μg/L (tableau I). Le milieu additionné de géraniol a été distribué à raison de 200 mL dans des flacons de 300 mL, que l'on a inoculé avec les levures précédemment multipliées en milieu liquide, à raison de 10^6 cellules/mL. Pour chaque levure, 9 flacons sont préparés pour chaque concentration différente de géraniol. Pendant la fermentation, qui a été suivie en mesurant la diminution du poids des flacons, on a mesuré l'alcool et les composés térpéniques produits et dénombré les cellules des levures totales en utilisant la chambre de Buerker.

Tableau I - Quantité de géraniol (μg/l) ajouté au milieu pour chaque souche de levure

Amounts of geraniol added to the fermentation medium

Souches de levure	milieu a	milieu b
IMIAT 478	194	862
IMIAT 409	166	795
IMIAT 432	178	852
IMIAT 170	217	1135
VL-1	210	1300
IMIAT 478 + Tween 80	161	906

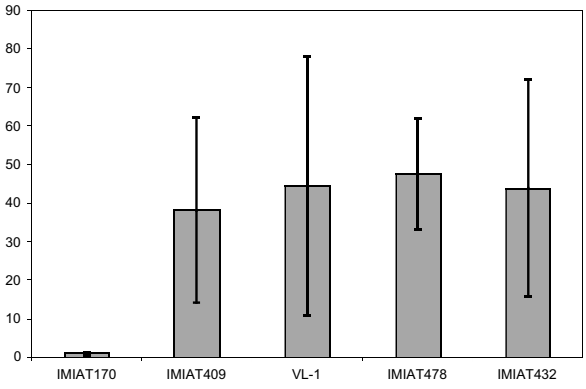


Fig. 1a - Teneur en géraniol (μg/l) à la fin de la fermentation alcoolique par différentes souches de levure (milieu a)

Amounts of geraniol (μg/l) at the end of fermentation by different strains of yeast (milieu a)

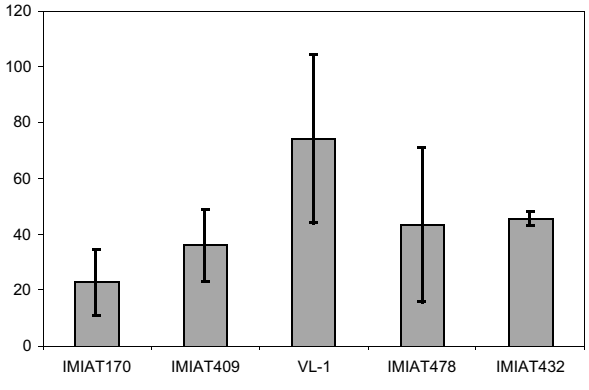


Fig. 1b - Teneur en citronellol (μg/l) à la fin de la fermentation alcoolique par différentes souches de levure (milieu a)

Amounts of citronellol (μg/l) at the end of fermentation by different strains of yeast (milieu a)

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

III - DÉTERMINATION DES TENEURS EN COMPOSÉS TERPÉNIQUES

Les milieux ont été extraits sur C-18 (DI STEFANO, 1991). L'extrait organique contenant les composés terpéniques libres a été analysé par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire HP-Innowax (30 m; 0,25 mm; 0,25 μm).

Les conditions chromatographiques étaient les suivantes: débit du gaz vecteur (H_2) 1,0 mL/min; température de l'injecteur (injection «split») 250 °C; température du four programmée à 40 °C, de 40 à 60 °C à raison de 40 °C/min, isotherme à 60 °C pendant 2 min, puis de 60 à 190 °C à raison de 2 °C/min, puis de 190 à 230 °C à raison de 5 °C/min et laissée à 230 °C pendant 15 min. La température du détecteur à ionisation de flamme était réglée à 250 °C.

Les analyses ont été réalisées sur trois flacons par prélèvement sur le milieu limpide après centrifugation pour séparer les levures.

Dans tous les cas, une partie du moût additionnée des mêmes quantités de géraniol, mais sans levure, a été placée dans les mêmes conditions, comme témoin.

La modalité avec la souche IMIAT 478 a été répétée avec l'addition de Tween 80 (1 mL/L) au milieu de la fermentation.

IV - ANALYSES STATISTIQUES

La signification statistique des résultats des teneurs en géraniol et en citronellol, pendant et à la fin de la fermentation alcoolique, a été évaluée en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) et le test de Duncan (SPSS, 1999).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

On observe dans les fermentations, avec une concentration en géraniol initial de l'ordre de 200 μg/L, qu'en fin de fermentation alcoolique, seule la souche IMIAT 170 présente une différence significative (test de Duncan) dans la consommation de géraniol par rapport aux autres souches de levure (figure 1a). Les résultats relatifs au géraniol résiduel sont exprimés en μg/L, mais ils ne changent pas, s'ils sont exprimés en pourcentage de géraniol initial. En ce qui concerne le citronellol (figure 1b), la souche VL-1 a produit une quantité significativement ($p = 0,99$) plus importante par rapport aux autres souches de levure. La souche IMIAT 170 a produit une quantité significativement ($p = 0,99$) plus faible par rapport aux souches VL-1, IMIAT 432

Tableau II - Quantité de linalol présente dans le milieu à la fin des fermentations avec les cinq souches de *Saccharomyces cerevisiae* et dans les témoins sans levure

Amount of linalol at the end of the fermentations and in the tests without yeasts

	Linalol (μg/L)	
	milieu a	milieu b
IMIAT 478	5,5	33,3
témoin sans levure	12,8	43,6
IMIAT 409	17,7	29,2
témoin sans levure	20,8	56,8
IMIAT 432	26,6	35,1
témoin sans levure	18,0	65,2
IMIAT 170	1	30,2
témoin sans levure	16,8	84,4
VL-1	9,2	33,4
temoin sans levure	17,9	94,2

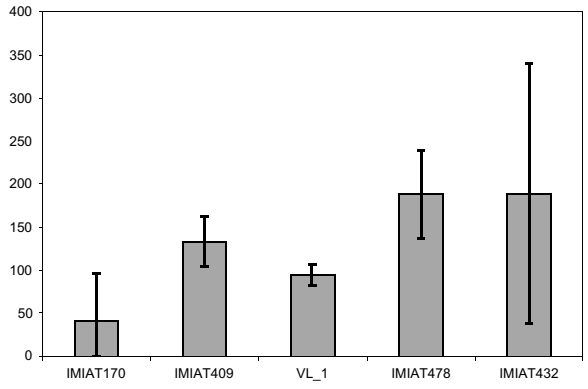


Fig. 2a - Teneur en géraniol (μg/l) à la fin de la fermentation alcoolique par différentes souches de levure (milieu b)

Amounts of geraniol (μg/l) at the end of fermentation by different strains of yeast (milieu b)

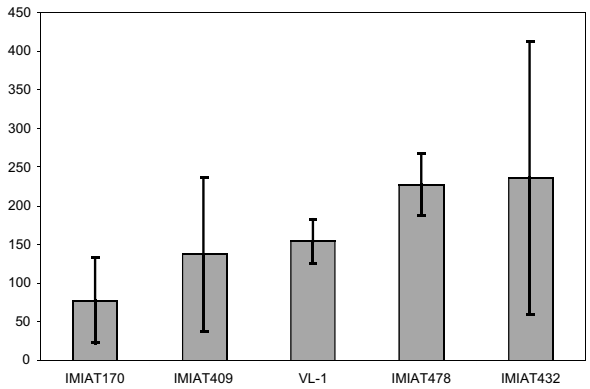


Fig. 2b - Teneur en citronellol (μg/l) à la fin de la fermentation alcoolique par différentes souches de levure (milieu b)

Amounts of citronellol (μg/l) at the end of fermentation by different strains of yeast (milieu b)

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2002, **36**, n°4, 221-225
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

et IMIAT 478. Les souches IMIAT 432, 478 et 409 ne sont pas significativement différentes entre elles. DUGELAY *et al.* (1992) ont observé une incidence plus importante des souches de levure sur la quantité de citronellol formée, avec une concentration initiale de géraniol de l'ordre de 200 μg/L. Cela peut être expliqué par la différence entre les souches de levure utilisées.

Nous avons enregistré des différences plus marquées parmi les levures lorsque la concentration initiale en géraniol est élevée (figure 2). En utilisant le test de Duncan, on obtient pour les résultats relatifs au géraniol (figure 2a) que les souches IMIAT 432, 478 et 409 sont un groupe homogène significativement différent par rapport au groupe VL-1, IMIAT 170. En ce qui concerne la production de citronellol (figure 2b), les souches IMIAT 478 et IMIAT 432 produisent les plus hautes concentrations, lesquelles sont significativement différentes par rapport aux autres souches. La production plus faible de citronellol par la souche IMIAT 170 est significativement différente par rapport aux levures VL-1, IMIAT 478 et IMIAT 432, alors que n'est pas significativement différent par rapport au levure IMIAT 409.

Les souches les plus performantes, dans ces conditions, sont donc l'IMIAT 478 et l'IMIAT 432, qui produisent les plus hautes concentrations en citronellol, avec des consommationes inférieures en géraniol par rapport aux autres souches de levure.

En ce qui concerne le linalol (tableau II), dans les moûts témoins sans levure, on observe une plus importante quantité de linalol par rapport à des moûts fermentés. Dans les fermentations, on retrouve à peu près les mêmes quantités, par rapport à la concentration initiale de géraniol et indépendemment de la levure utilisée. Cela confirme que la levure ne catalyse pas cette transformation (qui serait seulement une réaction chimique) et consiste en la transformation successive du géraniol en linalol et du linalol en α-terpinéol. KING et DICKINSON (2000) ont observé par contre la formation du linalol à partir du géraniol par *S. cerevisiae*, mais dans un milieu additionné de 25 mg/L de géraniol.

Dans la figure 3, sont présentés les résultats relatifs à l'évolution des teneurs en géraniol et en citronellol et de la population cellulaire pendant la fermentation alcoolique. On peut voir que la transformation du géraniol en citronellol a surtout lieu au début de la fermentation alcoolique. En outre, on observe que lorsque l'augmentation de la population cellulaire ralentit (entre le cinquième jour et la fin de la fermentation), la quantité de citronellol présente dans le milieu de fermentation augmente. Puisque les biosynthèses des stéroïdes et des terpénoides utilisent les mêmes étapes initiales et puisque le géraniol est un produit intermédiaire, qui participe à ces réactions, on peut en déduire que la formation de citronellol par la levure peut être une voie secondaire d'utilisation du géraniol, quand il n'est plus nécessaire dans la synthèse des lipides.

Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus dans un essai de fermentation avec la souche de levure IMIAT 478 dans les mêmes conditions, mais en ajoutant au milieu de fermentation le Tween 80, comme source d'acide oléique. Comme on peut voir dans la figure 4, dans l'essai additionné de Tween 80, le citronellol formé est significativement presque doublé.

CONCLUSION

La souche de levure utilisée pendant la fermentation des moûts aromatiques, qui ont comme composant aromatique principal le géraniol, est un élément déterminant pour la qualité des vins obtenus. En effet,

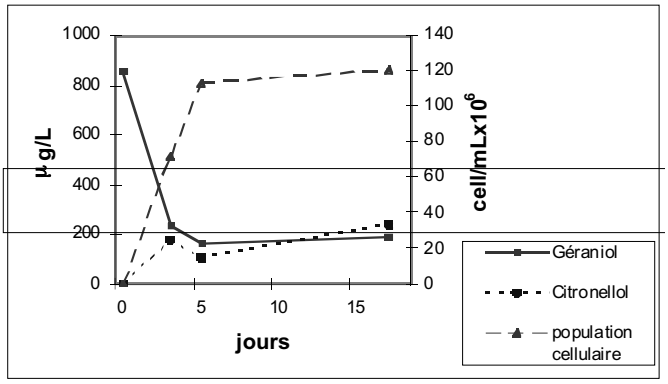


Fig. 3 - Évolution des teneurs en géraniol et en citronellol et de la population cellulaire pendant la fermentation alcoolique (souche IMIAT 432)

Evolution of amounts of geraniol and citronellol and of cellular population during alcoholic fermentation (strain IMIAT 432)

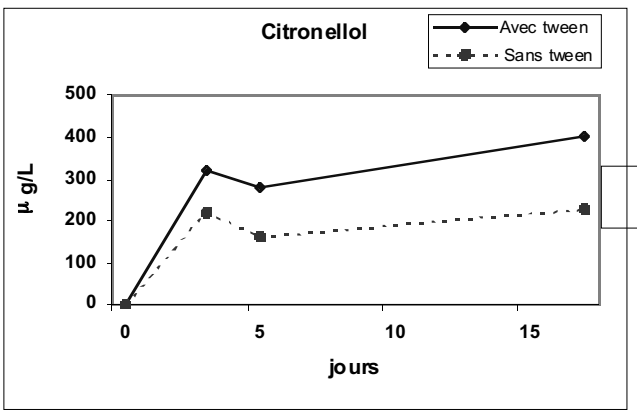


Fig. 4 - Influence de l'addition au milieu du Tween 80 sur la biosynthèse du citronellol par la levure

Influence of Tween 80 on the biosynthesis of citronellol

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

des souches différentes produisent des quantités plus ou moins importantes de citronellol, à partir du géraniol présent dans le moût. L'utilisation d'une souche appropriée de levure devient d'autant plus importante que la concentration initiale de géraniol du milieu est plus élevée.

Le contenu en acides gras insaturés du moût est important pour la teneur en géraniol et en citronellol à la fin de la fermentation alcoolique. Un contenu suffisant de ces composés dans le moût semble favoriser la production de citronellol.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

COLAS S., BONNET M.L., ORMIÈRES J.F., GERLAND C. et LURTON L., 1999. Incidence de la souche de levure sur la révélation du potentiel aromatique du cépage Grenache N: application à la sélection de souches pour la vallée du Rhône. *In: VI^e Symp. Int. Œnol.*, Bordeaux. Tec & Doc ed., Paris, p. 278-282.

DELTEIL D., BUREAU S., GUNATA Z., RAZUNGLES A. et DULAU L., 1999. Étude de l'effet de différentes levures sur la fraction aromatique des vins rouges de Syrah. *In: VI^e Symp. Int. Œnol., Bordeaux.* Tec & Doc ed., Paris, p. 274-277.

DI STEFANO R.,1987. Evoluzione dei composti responsabili dell'aroma di Moscato durante la maturazione dell'uva, la fermentazione dei mosti e la conservazione dei vini. *In: Atti Accademia Italiana Vite Vino*, XXXVIII, 233-244.

DI STEFANO R., 1991. Proposition d'une méthode de preparation de l'echantillon pour la détermination des terpènes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bull. O.I.V.*, **64**, 7-21.

DI STEFANO R. et CORINO L., 1984. Terpeni ed antociani di alcune uve rosse aromatiche. *Riv. Vitic. Enol.*, **37**, 581-595.

DI STEFANO R., MAGGIOROTTO G. et GIANOTTI S., 1992. Trasformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol.*, **45**, n°1, 43-49.

DUGELAY I., GUNATA Z., SAPIS J.C., BAUMES R. et BAYONOVE C., 1992. Étude de l'origine du citronellol dans les vins. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **26**, n°3, 177-184.

GARCIA MORUNO E., RIBALDONE M. et DI STEFANO R., 2000. L'idrolisi dei glicosidi terpenici della buccia dell'uva nella preparazione del mosto base delle uve aromatiche a frutto colorato. *Riv. Vitic. Enol.*, **53**, n° 1, 27-36.

GRAMATICA P., MANITTO P., RANZI B., DALBIANCO A. et FRANCAVILLA M., 1982. Stereospecific reduction of geraniol to (R)-(+)-citronellol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Experientia*, **38**, 775-776.

KING A. et DICKINSON J.R., 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **16**, 499-506.

SKOUROUMOUNIS G. K. et SEFTON M. A., 2000. Acid-catalyzed hydrolysis of alcohols and their β-D-Glucopyranosides. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2033-2039.

SPSS pour Windows, version 8.0.1 (1999). Spss inc.

Manuscrit reçu le 31 août 2001 ; accepté pour publication le 24 novembre 2002

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)