

# Acquisitions récentes sur les paramètres fermentaires influençant la saveur sucrée des vins secs

Axel Marchal<sup>1</sup>, Philippe Marullo<sup>1,2</sup>, Virginie Moine<sup>2</sup>, Denis Dubourdieu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut des Sciences de la Vigne et du Vin – Université de Bordeaux – Unité de recherche Œnologie  
Villenave-d'Ornon – France.

<sup>2</sup> Biolaflort – Bordeaux – France.



Extrait de la Revue  
des Œnologues n° 156  
[www.oeno.tm.fr](http://www.oeno.tm.fr)

TECHNIQUE

## Introduction

Au cours de l'élaboration des vins, la présence des lies de levure conduit à diverses modifications physico-chimiques, aromatiques et gustatives. La science œnologique a permis d'interpréter la plupart de ces phénomènes afin de mieux les maîtriser (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Nous avons précédemment montré que la sucrosité des vins secs augmente significativement avec la quantité de levures au cours de l'autolyse. La purification et l'analyse spectrométrique d'une fraction sapide isolée d'un autolysat de levure ont conduit à l'identification de peptides issues d'une protéine membranaire de choc thermique *Hsp12* (Marchal et al., 2011). Une souche de levure  $\Delta^{\circ}HSP12$ , ne différant de la souche œnologique Fx10 que par l'absence du gène *HSP12*, a été construite par des techniques de biologie moléculaire. Des expériences d'autolyse ont été menées en parallèle, dans un vin rouge, à l'aide des deux souches Fx10 et  $\Delta^{\circ}HSP12$ . L'analyse sensorielle des vins ainsi obtenus a permis de démontrer que la présence de la protéine *Hsp12* s'accompagne d'une augmentation de la sucrosité du vin. Le rôle de la protéine *Hsp12* dans l'effet édulcorant des lies de levures pourrait être direct ou indirect, par la libération de peptides qui en sont issus. Cette protéine de stress est impliquée dans la résistance de *Saccharomyces cerevisiae* à la température (Welker et al., 2010), au choc osmotique (*Siderius*,

■ **Tableau 1 : Références des souches de levure utilisées dans cette étude.**

Nom	Origine	Commentaire	Référence
Zymaflore Fx10	Laffort	Souche spécifique vin rouge	Marullo et al., 2009
$\Delta^{\circ}hsp12$	Collection de laboratoire	Souche obtenue à partir de Fx10 par délétion du gène <i>HSP12</i>	Marchal et al., 2011
D2	Collection de laboratoire	Souche de distillerie Yeast alcotech 24	Blein-Nicolas et al., 2013
W1	Collection de laboratoire	Isolée d'exsudats de bois	Blein-Nicolas et al., 2013
B1	Collection de laboratoire	Isolée de brasserie	Blein-Nicolas et al., 2013
Zymaflore VL3	Laffort	Souche spécifique vin blanc	
Actiflore F33	Laffort	Souche générique	
XMC30	Laffort	Souche en développement	

*Rots, and Mager 1997*), au stress oxydatif (Welker et al., 2010), à la congélation (Pacheco et al., 2009) ou à la dessiccation (Sales et al., 2000). Dans ces nouveaux travaux, nous étudions l'effet de divers paramètres génétiques et fermentaires sur la modulation de l'expression du gène *HSP12*. L'influence de la souche de levure sur l'intensité de la saveur sucrée est également mesurée (Marchal et al., 2015).

## Matériels et Méthodes

Les souches de levures utilisées dans ces travaux sont référencées au **tableau 1**. Les fermentations sont conduites en triplicat dans un milieu synthétique contenant 240 g/L de sucre (sur les graphiques, les barres d'erreur représentent les écarts type entre ces répliques et les différences significatives selon un test de Wilcoxon ( $\alpha = 0,05$ ) sont indiquées). Le suivi de l'avancement des fermentations est réalisé par mesure de la masse de CO<sub>2</sub> dégagée, la fermentation complète du milieu produit environ 108 g/L de CO<sub>2</sub>.

## Mesure de l'expression du gène *HSP12*

Le niveau d'expression du gène *HSP12* est mesuré par PCR quantitative. Les échantillons cellulaires sont récoltés par centrifugation et lavés avant une extraction des ARN totaux à l'aide de Tri Reagent (Sigma). L'ARNm est utilisé comme matrice pour produire de l'ADN complémentaire à l'aide du kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad). L'expression des gènes *HSP12* et *ADH1* est ensuite quantifiée par qPCR grâce à des amorces spécifiques (Marchal et al., 2015). La quantification est effectuée à l'aide d'une droite étalon, réalisée à partir d'une quantité d'ADN connue. Pour chaque échantillon, le niveau d'expression du gène *HSP12* est normalisé par celui du gène *ADH1* connu pour avoir une expression stable au cours de la fermentation alcoolique.

## Autolyse des levures

Afin de mimer les conditions d'une macération post-fermentaire à chaud, les autolyses des différentes souches de levures sont réalisées à 32 °C pendant 10 jours à l'abri de la lumière et sans agitation. Au terme de cette période, les vins sont centrifugés (4 000 RPM, 15 minutes) pour éliminer les lies et conservés à 4 °C sous gaz inerte jusqu'à leur analyse sensorielle.

## Analyses sensorielles

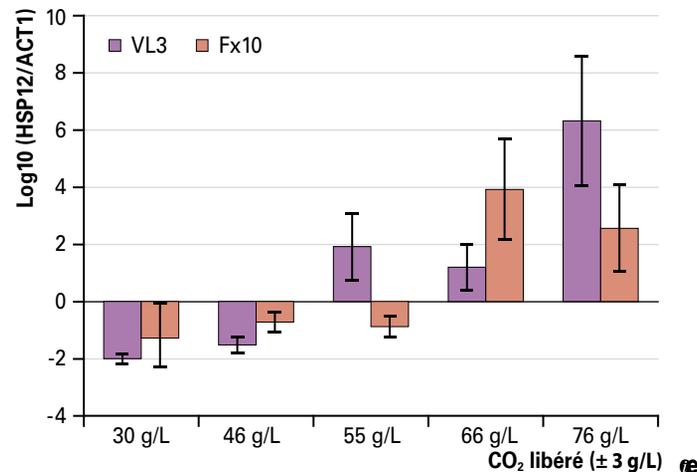
Les séances de dégustation ont lieu dans une salle dédiée à l'analyse sensorielle et équipée de postes individuels. Les 17 juges (de 21 à 64 ans) sont entraînés à la dégustation de vin. Les échantillons sont dégustés à 18 °C dans des verres AFNOR noirs présentant un code d'anonymat à 3 chiffres. Après un entraînement à la perception des saveurs fondamentales, il a été demandé aux dégustateurs de noter l'intensité de la saveur sucrée des vins sur une échelle discrète allant de 0 à 7. Les résultats sont traités par une analyse de variance, conformément aux recommandations de l'organisation internationale de normalisation (ISO 11056:1999). Un test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ) est appliqué afin de distinguer les groupes d'échantillons significativement distincts.

## Résultats

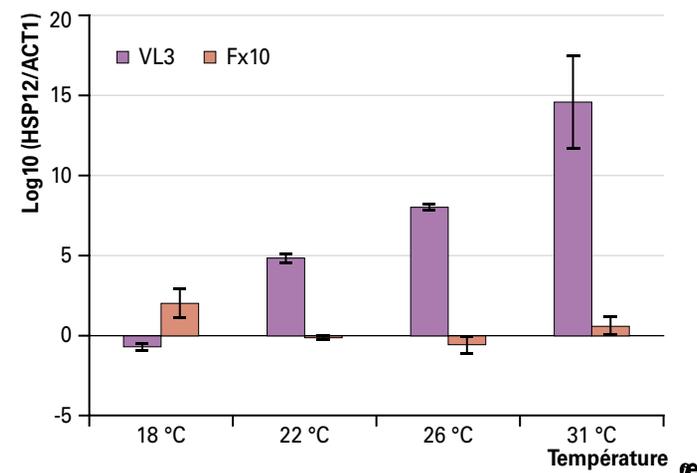
### Évolution de l'expression du gène *HSP12* au cours de la fermentation alcoolique pour 2 souches de levure Fx10 et VL3

Des fermentations sont conduites en milieu synthétique à partir de deux souches œnologiques : Fx10 et VL3. Le niveau d'expression du gène *HSP12* est mesuré, pour chacune des souches, à différents stades de la fermentation alcoolique (après libération de 30, 46, 55, 66 et 76 g/L de CO<sub>2</sub>). Les résultats présentés à la **figure 1** montrent que le niveau d'expression de *HSP12* augmente progressivement avec l'avancement de la fermentation alcoolique, pour les deux souches. Cette expérience confirme des travaux précédents et suggère que l'éthanol produit au cours de la fermentation alcoolique pourrait engendrer un stress à l'origine de l'expression accrue de *HSP12*. Si l'éthanol a un goût sucré lorsqu'il est dégusté à faible concentration dans l'eau, nous avons précédemment démontré que l'ajout de 1,5 % d'éthanol à un vin sec ne modifiait pas la perception de sa saveur sucrée. Pourtant, les dégustateurs experts perçoivent fréquemment une sucrosité intense dans les vins à fort degré alcoolique. Cela pourrait s'expliquer par l'effet inducteur de l'éthanol sur l'expression de *HSP12* : dans les vins à fort degré alcoolique, la synthèse de *Hsp12* est plus importante en fin de fermentation, ce qui confère une saveur sucrée plus intense. En outre, des différences significatives sont observées entre les souches à 50 g/L et 76 g/L de CO<sub>2</sub> libéré. La souche VL3

■ **Figure 1 :** Suivi de l'expression d'*HSP12* pendant la fermentation alcoolique à 26 °C de 2 souches de levure FX10 et VL3.



■ **Figure 2 :** Effet de la température de fermentation sur le niveau d'expression *HSP12*.



apparaît plus sensible au stress engendré par l'éthanol, ce qui est à relier avec son utilisation pour la vinification des vins blancs.

### Impact de la température de fermentation sur l'expression d'*HSP12* pour 2 souches de levure Fx10 et VL3

Des fermentations sont conduites en milieu synthétique à partir des souches VL3 et Fx10 et à différentes températures (18, 22, 26 et 31 °C). Un prélèvement de biomasse est effectué à mi-fermentation (46 g/L de CO<sub>2</sub> produit) afin de mesurer le niveau d'expression de *HSP12*. Les résultats présentés à la **figure 2** montrent que les deux souches ont un comportement différent en fonction de la température. Pour la souche VL3, l'expression de *HSP12* augmente significativement avec la température, ce qui est cohérent avec des résultats publiés précédemment. En effet, *Hsp12* est une protéine de réponse au choc thermique et sa synthèse permet donc à la levure de mieux résister à une augmentation de la température du milieu. Dans le cadre de l'élaboration des vins blancs avec cette souche, les résultats obtenus suggèrent donc qu'une température de fermentation de 22 °C permettra d'obtenir des vins avec une sucrosité plus intense qu'à 18 °C, sans pour autant compromettre l'aptitude fermentaire. La souche Fx10 semble en revanche plus résistante au stress thermique, la température n'a pas d'influence significative sur l'expression de *HSP12* dans une gamme de valeurs compatibles avec les

fermentations œnologiques. Cela démontre qu'il n'y a pas d'intérêt, en ce qui concerne la sucrosité, à fermenter les vins rouges à 31 °C plutôt qu'à 26 °C : l'expression de *HSP12* n'est pas augmentée, alors que l'achèvement de la fermentation peut être plus délicat. Ce résultat est à relier avec son utilisation dans le cadre de vinifications en rouge, généralement réalisées à des températures plus élevées. Par ailleurs, cette souche a été obtenue par des rétrocroisements visant à lui conférer une résistance particulière à la température, ce qui peut expliquer l'absence d'effet de ce paramètre sur l'expression de *HSP12*.

### Mesure de l'expression du gène *HSP12* à mi-fermentation pour différentes souches de levure

Des fermentations sont conduites en milieu synthétique à partir de 8 souches de levure, dont 4 souches œnologiques commerciales, la souche  $\Delta^{\circ}$ *HSP12*, qui diffère de la souche Fx10 uniquement par l'absence du gène *HSP12* et 3 souches issues d'autres biotopes (distillerie, brasserie et exsudats de chêne). Ces trois dernières souches ont d'ailleurs donné lieu à des fermentations languissantes, qui n'ont pu aller jusqu'à leur terme, ce qui confirme leur mauvaise adaptation aux conditions œnologiques. Un échantillon de biomasse est prélevé à 46 g/L de CO<sub>2</sub> libéré afin de mesurer l'expression du gène *HSP12*. À ce stade, toutes les fermentations étaient encore actives et les levures collectées



Article publié avec l'aimable autorisation de la Revue des Œnologues

N° 156 Juillet 2015 – pages 26 à 28

« Acquisitions récentes sur les paramètres fermentaires influençant la saveur sucrée des vins secs »

– Axel Marchal, Philippe Marullo, Virginie Moine, Denis Dubourdiou

La référence internationale de l'actualité scientifique et technique vitivinicole, depuis plus de 44 ans en France et dans 60 pays.

■ Plus de 1 200 articles archivés par mots clés [www.oeno.tm.fr](http://www.oeno.tm.fr)

■ Pour tout contact : [infos@mail.oeno.tm.fr](mailto:infos@mail.oeno.tm.fr) ■

présentaient un fort taux de viabilité. La **figure 3** montre que le niveau d'expression de *HSP12* varie significativement en fonction de la souche de levure. Le test de Duncan permet de distinguer 4 groupes de souches statistiquement distincts. Les niveaux d'expression de *HSP12* les plus élevés sont observés pour deux souches non-œnologiques.

### Influence de la souche de levure sur la perception de la saveur sucrée d'un vin sec après autolyse

Un vin ne contenant pas la protéine *Hsp12* est obtenu par fermentation d'un moût de Merlot issu de thermovinification par la souche  $\Delta^{\circ}HSP12$ . En parallèle, la biomasse des huit souches étudiées précédemment a été récoltée à mi-fermentation et ajoutée dans le vin de Merlot à des concentrations similaires à celles observées lors de la vinification. Comme le vin est sec, les levures ne peuvent se développer. Afin de favoriser leur autolyse, les vins sont placés à 32 °C pendant 10 jours, afin de mimer les conditions d'une macération post-fermentaire à chaud. À l'issue de cette période, les différentes modalités sont centrifugées, pour éliminer les levures, puis dégustées. Le panel doit alors noter l'intensité de la saveur sucrée, sur une échelle de 0 à 7.

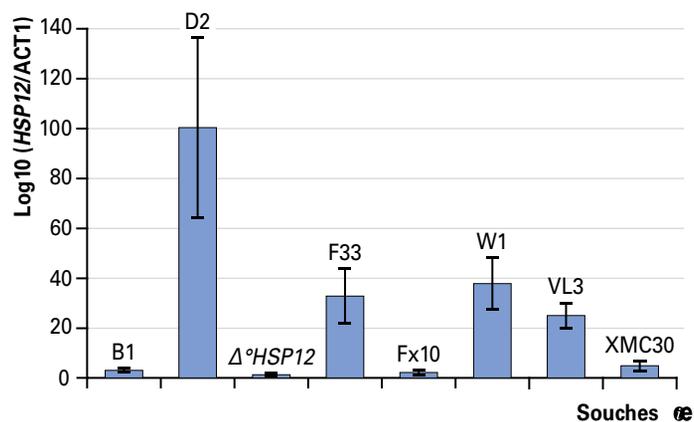
L'analyse de variance révèle qu'il n'y a pas d'effet « juge ». Ce consensus entre les dégustateurs montre l'efficacité de l'entraînement sensoriel préliminaire. En revanche, les résultats montrent un fort effet « souche », c'est-à-dire que les dégustateurs ont perçu des variations nettes de sucrosité en fonction de la souche de levure utilisée pour l'autolyse (**figure 4**). On observe que la souche Fx10 présente une intensité de la saveur sucrée plus élevée que ce que suggérait son niveau d'expression de *HSP12*. Cela pourrait notamment s'expliquer par les mécanismes post-fermentaires impliqués dans la libération de la protéine *Hsp12*

et de ses peptides sucrés. Malgré cela, un test statistique indique une corrélation entre ces données sensorielles et les niveaux d'expression du gène *HSP12* ( $p$ -value = 0,06). Par conséquent, ces résultats démontrent pour la première fois que la souche de levure influence significativement le goût du vin. Les différences de saveur sucrée sont corrélées aux variations de l'expression du gène codant pour la protéine *Hsp12*.

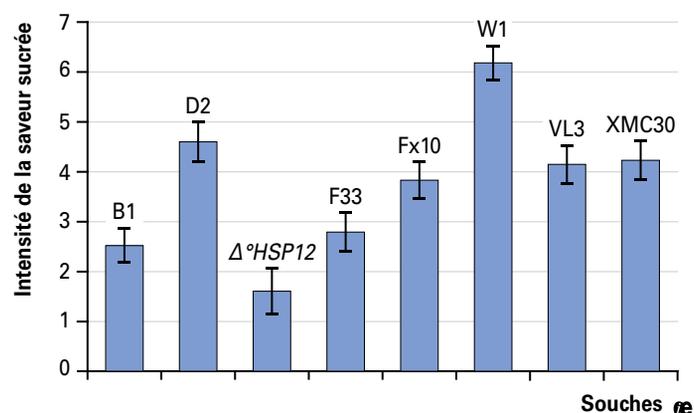
### Conclusion

Nos travaux consacrés à la saveur sucrée des vins secs ont été poursuivis en vue d'améliorer la connaissance de ses bases moléculaires et des facteurs œnologiques permettant d'en moduler l'intensité. Grâce à l'utilisation simultanée de techniques de biologie moléculaire et d'analyse sensorielle, nous avons pu mesurer l'influence de paramètres fermentaires sur la sucrosité conférée par les levures. Il apparaît que l'avancement de la fermentation alcoolique et la température de celle-ci influencent l'expression du gène *HSP12*, de façon différentielle en fonction de la souche. En outre, nous avons démontré que la saveur sucrée perçue à la dégustation variait en fonction de la souche de levure utilisée lors de l'autolyse. Cette variation est corrélée avec l'expression du gène codant pour la protéine *Hsp12*, dont l'implication dans le gain de sucrosité avait été précédemment démontrée. Ces recherches ouvrent de nouvelles perspectives sur la maîtrise du goût au cours de l'élaboration du vin. Elles devront être continuées afin d'identifier les peptides sucrés issus de *Hsp12* et ainsi de préciser les conditions post-fermentaires favorisant leur libération dans le vin. En outre, l'aptitude de la levure à augmenter la saveur sucrée du vin peut apparaître comme un nouveau critère entrant en ligne de compte pour la sélection de nouvelles souches œnologiques. ■

■ **Figure 3: Expression d'*HP12* selon la souche de levure à mi-fermentation.**



■ **Figure 4: Impact de la souche de levure sur la perception de sucrosité après autolyse corrélation à l'expression *HSP12*.**



### ■ Bibliographie

- M. Blein-Nicolas, W. Albertin, B. Valot, P. Marullo, D. Sicard, C. Giraud, S. Huet, et al., 2013. "Yeast Proteome Variations Reveal Different Adaptive Responses to Grape Must Fermentation." *Mol Biol Evol* 30 (6): 1368–83. doi:10.1093/molbev/mst050.
- A. Marchal, P. Marullo, C. Durand, V. Moine, D. Dubourdieu, 2015. "Fermentative Conditions Modulating Sweetness in Dry Wines: Genetics and Environmental Factors Influencing the Expression Level of the *Saccharomyces Cerevisiae* *HSP12* Gene." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (1): 304–11. doi:10.1021/jf504408t.
- A. Marchal, P. Marullo, V. Moine, D. Dubourdieu, 2011. "Influence of Yeast Macromolecules on Sweetness in Dry Wines: Role of the *Saccharomyces Cerevisiae* Protein *Hsp12*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (5): 2004–10.
- P. Marullo, C. Mansour, M. Dufour, W. Albertin, D. Sicard, M. Bely, D. Dubourdieu, 2009. "Genetic Improvement of Thermo-tolerance in Wine *Saccharomyces Cerevisiae* Strains by a Backcross Approach." *FEMS Yeast Research* 9 (8): 1148–60.
- A. Pacheco, C. Pereira, M.-J. Almeida, M. J. Sousa, 2009. "Small Heat-shock Protein *Hsp12* Contributes to Yeast Tolerance to Freezing Stress." *Microbiology* 155 (Pt 6): 2021–28. doi:10.1099/mic.0.025981-0.
- P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche, A. Lonvaud, 1998. "Traité d'Enologie. Tome 1. Microbiologie Du Vin. Vinifications." Paris: Dunod.
- Sales, Kurt, Wolf Brandt, Elaine Rumbak, and George Lindsey, 2000. "The LEA-like Protein *HSP 12* in *Saccharomyces Cerevisiae* Has a Plasma Membrane Location and Protects Membranes Against Desiccation and Ethanol-induced Stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1463 (2): 267–78. doi:10.1016/S0005-2736(99)00215-1.
- Siderius, Marco, Eveline Rots, and Willem H. Mager, 1997. "High-osmolarity Signalling in *Saccharomyces Cerevisiae* Is Modulated in a Carbon-source-dependent Fashion." *Microbiology* 143 (10): 3241–50. doi:10.1099/00221287-143-10-3241.
- Welker, S., B. Rudolph, E. Frenzel, F. Hagn, G. Liebisch, G. Schmitz, J. Scheuring et al., 2010. "*Hsp12* Is an Intrinsically Unstructured Stress Protein That Folds Upon Membrane Association and Modulates Membrane Function." *Molecular Cell* 39 (4): 507–20.