



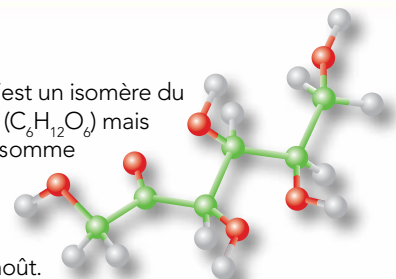
# Paroles D'EXPERT

Informations pratiques sur la vinification

## L'UTILISATION DU FRUCTOSE PAR LES LEVURES DE VINIFICATION

Qu'est-ce que le fructose ?

Le fructose est une cétone polyhydroxylée à 6 atomes de carbone. C'est un isomère du glucose, c'est-à-dire que tous deux ont la même formule moléculaire ( $C_6H_{12}O_6$ ) mais qu'ils se différencient par leur structure. C'est l'un des sucres que consomme la levure pendant la fermentation du vin.



Pourquoi est-il important pour la vinification ?

Le glucose et le fructose sont les sucres les plus fermentescibles du moût. Pendant la fermentation alcoolique, les levures convertissent la majeure partie du glucose et du fructose présents en alcool et  $CO_2$ . Les moûts de raisin contiennent habituellement des quantités égales de glucose et de fructose, et leurs concentrations totales vont généralement de 160 à 300 g/litre.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est une levure glucophile qui préfère le glucose au fructose. Durant la fermentation, le taux de conversion du glucose étant plus élevé que celui du fructose, la proportion de fructose augmente au fil de la fermentation. Cela peut entraîner des déséquilibres dans le vin et, dans les conditions difficiles de fin de fermentation, les levures peuvent avoir du mal à utiliser ce sucre qu'elles apprécient moins. Ainsi, savoir comment les levures de vinification utilisent le fructose est essentiel pour maintenir une fermentation alcoolique régulière et limiter le risque d'arrêt de la fermentation.

Quels sont les facteurs qui ont une incidence sur l'utilisation du fructose pendant la fermentation ?

### Azote :

Pendant la fermentation alcoolique, les sucres sont consommés essentiellement pendant la phase stationnaire. Pendant cette phase, l'azote devient de moins en moins disponible et, comme c'est un nutriment essentiel contribuant au transport des sucres dans la cellule par le biais de la synthèse protéique, cela explique en partie pourquoi le métabolisme des levures et l'activité de fermentation diminuent (Salmon, 1996). Le niveau d'alcool augmente également peu à peu, devenant toxique pour la cellule levurienne, et l'utilisation de fructose est donc encore plus compromise. Par conséquent, il est recommandé d'avoir un niveau minimum de 150 mg/L d'azote assimilable par la levure ou de supplément complexe de nutrition.

### Rapport glucose/fructose (RGF) :

La cinétique d'utilisation des sucres par *S. cerevisiae* pendant la fermentation est très étroitement liée au transport du sucre, et le glucose est généralement consommé à un taux plus rapide que le fructose. Dans les fermentations lentes, le taux de fermentation se voit réduit une fois que la plus grande partie du glucose est consommée, et la fermentation peut alors s'arrêter et laisser une concentration importante de fructose résiduel. D'après la littérature, le niveau de glucose résiduel dans les vins en arrêt équivaut au dixième de la concentration en fructose. D'après Gafner and Schütz (1996), il est possible de prédire l'arrêt de la fermentation lorsque le rapport glucose/fructose est inférieur à 1.0.

### Levure :

Il a également été démontré que la préférence accordée au glucose plutôt qu'au fructose dépend de la levure, et les écarts de consommation de glucose et de fructose ne constituent pas un paramètre fixe, mais dépendent du patrimoine génétique de la levure et des conditions externes (Berthels et al., 2004). Des travaux de recherche ont permis de découvrir les gènes qui codent les transporteurs d'hexose. Dans les conditions œnologiques, plusieurs gènes contribuent au transport du sucre, qui est régulé par une grande famille de gènes appelée HXT. Il existe 20 gènes HXT. Hxt1 et Hxt7 sont les transporteurs principaux. Hxt2, Hxt6 et Hxt7 sont des transporteurs à haute affinité, alors que Hxt1 et Hxt3 sont des transporteurs à basse affinité. D'autres transporteurs Hxt sont d'affinité intermédiaire. Les transporteurs à forte affinité et ceux à faible affinité ont une plus grande affinité pour le glucose que pour le fructose, ce qui peut affecter le taux d'utilisation de ces hexoses. Les concentrations des hexoses dans le milieu ont une influence sur l'expression des différents gènes HXT (Perez et al., 2005 ; Guillaume et al., 2007). Il a été montré que Hxt3 facilite fortement la fermentation (Luyten et al., 2002) et des études ont également établi que ce gène est responsable de l'utilisation du fructose par certaines levures (Guillaume et coll., 2007).

## LES RÉSULTATS

L'utilisation du fructose par les levures de vinification est essentielle au maintien d'un taux de fermentation constant à la fin de la fermentation alcoolique. Le fructose devient le principal sucre disponible lors des dernières phases de fermentation alcoolique, et les levures de vinification doivent alors fermenter ce sucre moins apprécié dans des conditions difficiles. Le stress lié à ces conditions peut être amplifié par des déséquilibres nutritionnels et altérer l'activité des levures, ce qui peut entraîner le ralentissement ou l'arrêt de la fermentation (Guillaume *et al.*, 2007). Dans de telles situations, on pense que la faible capacité d'utilisation du fructose par *S. cerevisiae* contribue à la faiblesse du taux de fermentation. Comme expliqué plus haut, certaines levures de vinification diffèrent naturellement dans leur capacité à utiliser le fructose. Cette capacité se mesure par l'indice de fructophilie. Cet indice se détermine en calculant l'aire entre la courbe de consommation du glucose et celle de consommation de fructose, en fonction du volume de CO<sub>2</sub> libéré par la levure; il sert de critère pour évaluer la capacité de chaque levure à consommer du fructose. Les données de la seconde moitié de la fermentation servent aux calculs, alors que l'activité de consommation du sucre est optimale. Plus l'aire est petite, plus la cinétique de consommation du fructose se rapproche de celle du glucose (Dumont *et al.*, 2009).

Dans ces conditions (température de fermentation : 24 °C, milieu synthétique riche en azote assimilable (MS300) et riche en sucres, total des sucres : 260 g/L, RGF = 1 (glucose = 130 g/L et fructose = 130 g/L), on obtient le classement suivant (figure 1). La levure la plus efficace en termes d'utilisation du fructose est Uvaferm 43® YSEO®, et la moins efficace est Lalvin 71B® YSEO®.

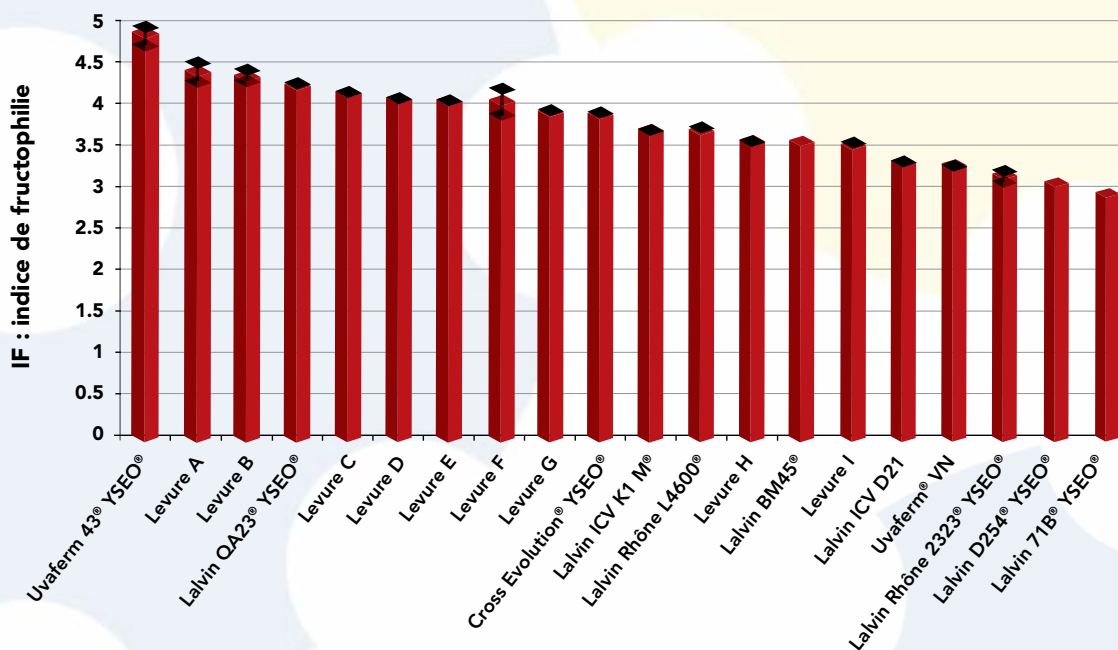


Figure 1. Classement des levures sélectionnées en fonction de leur consommation de sucre

À partir de ces résultats, les performances de quelques levures ont été évaluées sous différentes conditions qui peuvent avoir un impact sur l'utilisation du fructose. La figure 2 montre l'indice de fructophilie des levures sélectionnées sous les mêmes conditions, mis à part que le RGF varie de 1 (optimal) à 0,33 (difficile), ce qui veut dire que la concentration de glucose dans le moût est plus faible que celle de fructose, ce qui force la levure à utiliser le fructose. Les conditions étaient les suivantes : température de fermentation : 24 °C, milieu synthétique riche en azote assimilable (MS300) et riche en sucres, total des sucres : 260 g/L, RGF = 1 (glucose = 130 g/L et fructose = 130 g/L) ou RGF = 0,33 (glucose = 65 g/L, fructose = 195 g/L). Sous ces conditions, Uvaferm 43® YSEO® est toujours plus performante que les autres levures, même si, à un RGF de 0,33, l'indice de fructophilie diminue, et ce, pour toutes les levures.

Dans un milieu pauvre en azote assimilable (MS70 = 100 ppm d'azote assimilable), la durée de fermentation était jusqu'à quatre fois plus importante que dans un milieu riche en azote assimilable (MS300 = 400 ppm d'azote assimilable). Les niveaux de départ de l'azote ont un effet sur l'activité de fermentation des levures, mais n'ont pas d'impact sur leur capacité à utiliser le fructose. À ces deux niveaux d'azote, Uvaferm 43® YSEO® présentait la meilleure capacité d'utilisation du fructose (figure 3).

## LES RÉSULTATS (suite)

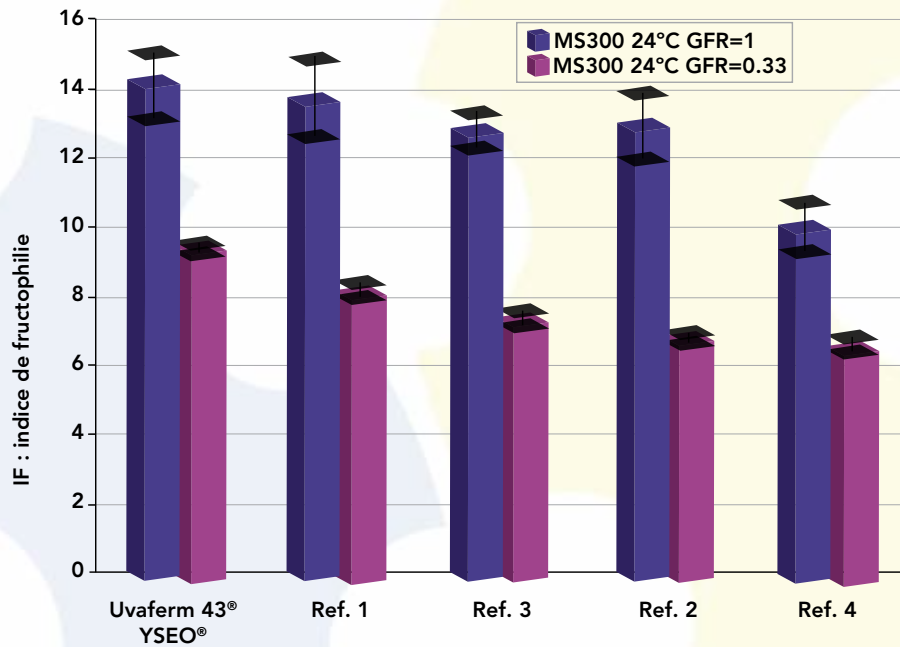


Figure 2. Impact du RGF sur l'indice de fructophilie des levures sélectionnées

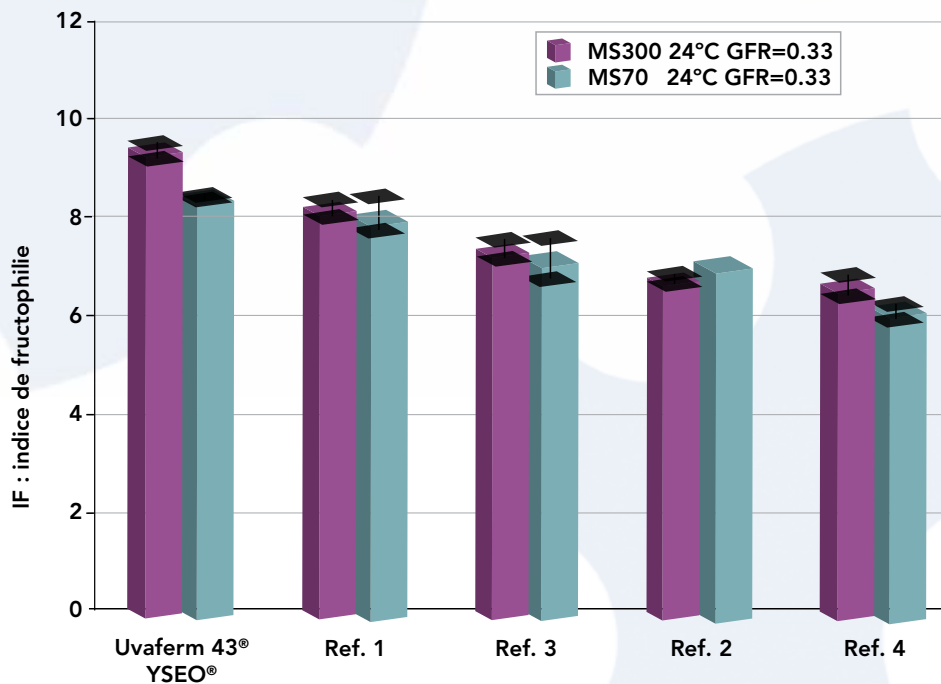


Figure 3. Classement des levures sélectionnées selon leur capacité d'utilisation préférentielle du fructose dans des milieux présentant un rapport glucose/fructose de 0,33 et différentes concentrations en azote (déficit en azote : MS70 ou haute concentration : MS300)



### Dr. JÜRIG GAFNER

Jürg Gafner est microbiologiste à la Station de recherche Agroscope de Changins-Wädenswil à Wädenswil, en Suisse. Depuis 1990, il dirige des projets de recherche en écologie des microorganismes de vinification, avec un intérêt particulier pour le ralentissement et l'arrêt des fermentations alcooliques. Ses projets se concentrent notamment sur la composition et la dynamique

de populations des microorganismes désirables et indésirables et sur la production de produits métaboliques désirables et indésirables en vinification. Un autre point d'intérêt particulier concerne la prévention et le traitement des ralentissements et arrêts des fermentations qu'entraîne un déséquilibre entre le glucose et le fructose au cours de la fermentation alcoolique. Les résultats de Jürg Gafner ont été publiés dans plus de 30 publications scientifiques et 100 articles de recherche appliquée. Il a présenté ses résultats au cours de plus d'une centaine de conférences, la plupart du temps en tant qu'intervenant invité.

fermentation est à l'arrêt sans pour autant altérer leur qualité. Nous avons choisi l'une des souches sélectionnées de *Zygosaccharomyces bailii* et l'avons achetée sous le nom de Fructoferm W3. À l'aide de cette souche, nous avons réussi à relancer la fermentation, mais le traitement nécessite beaucoup de temps : il dure des semaines, voire des mois, et finalement, après l'augmentation du RGF (> 1,0), une levure de type *Saccharomyces cerevisiae* doit être présente dans le vin pour achever la fermentation alcoolique. Par chance, nous avons isolé une souche de *Saccharomyces cerevisiae*, connue sous le nom de Fructoferm W33, capable de passer d'un génotype et d'un phénotype glucophiles à un génotype et un phénotype fructophile.

En 2008, nous avons finalement sélectionné, à partir de vieilles bouteilles de vin (photo), six souches de *Saccharomyces cerevisiae*, présentant un génotype et un phénotype fructophiles qui le restaient. Dans tous les tests réalisés jusqu'à présent, les six souches sont avérées très efficaces pour prévenir l'arrêt de la fermentation ou pour la relancer et pour produire des vins de cépage typiques. Après avoir caractérisé le phénotype des six souches de levure, nous nous sommes également intéressés à la caractérisation de leur génotype. Supposant que l'hexokinase I et l'hexokinase II jouent un rôle clé dans le processus, nous avons séquencé le génome de ces deux enzymes. Dans la séquence codante de l'hexokinase I, nous avons identifié à la position 513 une mutation responsable de la transformation d'un acide aminé, l'alanine, en valine; dans la séquence codante de l'hexokinase II, nous avons identifié à la position 1267 une mutation responsable de la transformation de l'isoleucine en valine. Il s'agit là de mutations tout à fait mineures. Toutefois, la drépanocytose est elle aussi due à la transformation de la glutamine en valine en raison d'une mutation du gène de l'hémoglobine. Nous espérons obtenir davantage d'informations sur la conversion génique ou sur l'analyse des séquences du génome complet afin d'identifier un génotype fructophile. Vous êtes intéressés par l'utilisation de ces souches? Il y a tout lieu de croire que l'une d'elles sera disponible pour les vendanges de l'automne 2013. En Suisse et dans les régions viticoles les plus proches, cette souche de levure fructophile a déjà permis la fermentation réussie de 500 000 litres de vin.

### AU SUJET DE L'EXPERT

Les arrêts de fermentation figurent en deuxième place des problèmes les plus dommageables rencontrés par les viticulteurs du monde entier. Ils peuvent être attribuables à plusieurs causes. D'après nos observations, dans environ 95 % des cas, ces arrêts de fermentation ont lieu lorsque le rapport glucose/fructose (RGF) est inférieur à 1.0. Nous avons montré que seule l'augmentation du RGF permettait la poursuite de la fermentation alcoolique. Par ailleurs, des expériences ont clairement démontré que l'on pouvait remédier à l'arrêt de la fermentation par une adjonction de glucose ou par un appauvrissement en fructose, ces deux traitements entraînant une augmentation du RGF.

Dans d'autres expériences, nous avons induit un arrêt des fermentations alors que ces dernières se déroulaient normalement, par épuisement du glucose ou par ajout de fructose. Nous en concluons que le meilleur moyen de remédier à l'arrêt de la fermentation est l'adjonction de glucose. Malheureusement, cette méthode est partout interdite. En outre, ce traitement entraîne une augmentation indésirable du taux d'alcool. Pour permettre l'appauvrissement en fructose, nous avons isolé des souches de levures fructophiles des espèces *Candida stellate* et *Zygosaccharomyces bailii*. Ces levures sont connues pour détériorer la qualité du vin, mais par chance nous avons pu sélectionner des souches capables de dégrader le fructose dans les vins dont la

## RÉSUMÉ

Les levures sélectionnées diffèrent par leur capacité à consommer le fructose et cela peut avoir un impact important sur les performances de fermentation, en particulier sous des conditions difficiles. Uvaferm 43® YSEO® possède l'indice de fructophilie le plus élevé, ce qui indique que cette levure possède la meilleure capacité d'absorption du fructose, quels que soient le RGF, la concentration en azote ou la température. L'indice de fructophilie d'une levure de vinification est un indicateur de ses performances dans des moûts potentiellement problématiques, où le RGF est faible et/ou les caractéristiques du moût peuvent poser problème.

**Le prochain Parole d'Expert : Le glutathion et son impact dans les vins**