

# Paroles D'EXPERT

## Informations pratiques sur la vinification

### LE GLUTATHION ET SON UTILISATION EN VINIFICATION

Qu'est-ce que le glutathion?

Le glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinylglycine) est un tripeptide constitué de trois acides aminés: le glutamate, la cystéine et la glycine.

Dans le moût, le vin ou même la levure, on peut le trouver sous sa forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG), celle-ci se composant de deux molécules de glutathion liées par un pont disulfure.

On le trouve dans les végétaux et les aliments, notamment dans les fruits tels que le raisin. C'est aussi le composé soufré non protéique le plus répandu dans la plupart des organismes vivants, y compris dans la levure de vinification *Saccharomyces cerevisiae*.

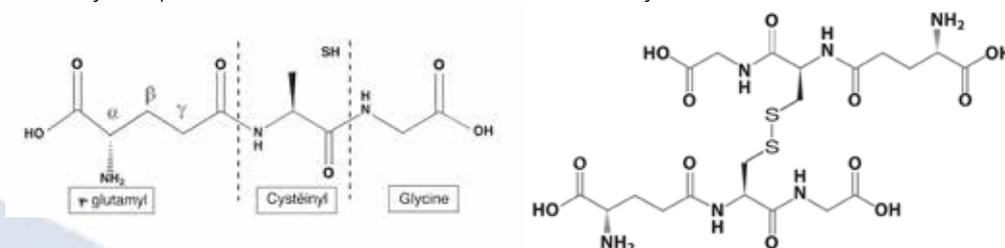


Figure 1. Structures moléculaires du glutathion (GSH) et du disulfure de glutathion (GSSG)

Pourquoi est-il important dans le vin?

Le glutathion (GSH) est important dans le vin parce qu'il a la capacité à piéger les ortho-quinones, principaux protagonistes du brunissement et de la perte d'arôme due aux mécanismes d'oxydation. En raison de son potentiel d'oxydoréduction très faible ( $E'_{o} = -250$  mV à pH 7,0;  $E'_{o} = -40$  mV à pH 3,0), il peut agir comme puissant tampon dans de nombreuses réactions cellulaires d'oxydoréduction. On sait depuis des années qu'il est un antioxydant plus puissant que l'acide ascorbique ( $E'_{o} = +60$  mV à pH 7,0;  $E'_{o} = +267$  mV à pH 3,0). Il joue également un rôle essentiel dans la prévention de l'oxydation des phénols du moût en réagissant par le biais de son groupement -SH avec l'acide caftarique, l'un des phénols les plus sujets à l'oxydation dans les moûts, et en générant du GRP (Grape Reaction Product), un composé stable et incolore (Moutounet et al., 2001). Ce mécanisme a été démontré pour le glutathion, et pas pour les autres composés présents dans le moût ou dans la levure et possédant un groupement -SH (comme la cystéine ou la glutamyl-cystéine, par exemple).

Le GSH peut également entrer en concurrence pour les o-quinones avec plusieurs thiols (composés aromatiques tels que le 3-mercapto-hexanol (3MH), son acétate : l'acétate de 3-mercaptohexanol (A3MH) et la 4-méthyl-mercaptopentane (4MMP)), présents dans les moûts et les vins sous la forme de précurseurs ou de molécules aromatiques, protégeant ainsi certains arômes du vin (Dubourdieu et al., 2003). Les effets du GSH comme antioxydant naturel préservant l'arôme et la couleur du vin sont aujourd'hui bien compris.

Comment peut-on influencer les niveaux de glutathion dans le moût et le vin?

Des niveaux élevés de glutathion dans le vin sont importants pour la préservation de l'arôme et de la couleur. Le niveau de glutathion peut varier dans le moût, dans la mesure où il est lié aux cépages et aux pratiques de viticulture et de vinifications.

Le glutathion ne pouvant être ajouté au moût ou au vin, l'utilisation d'une levure inactivée spécifique riche en glutathion (LIS riche en GSH, telle qu'Optimum White® et OptiWhite®) devient une intéressante solution naturelle d'optimisation de la qualité des vins. Les LIS riches en GSH diffèrent les unes des autres en ce qui concerne la quantité et la qualité de GSH qu'elles contiennent, et la façon dont on effectue la mesure de la quantité nécessaire a également son importance. Il est particulièrement important d'avoir du GSH sous sa forme réduite, puisque c'est la forme antioxydante active.

Des levures spécifiques ont été sélectionnées dans le portefeuille de levures œnologiques de Lallemand, pour la production de différents produits dont OptiWhite® et OptiMUM White® (brevet N°WO/2005/080543), et le processus de multiplication, d'inactivation et de séchage de la levure est également adapté de manière à obtenir une haute teneur en glutathion réduit

## Comment peut-on influencer les niveaux de glutathion dans le moût et le vin?

soluble dans la biomasse correspondante. Une fois ajoutée dans le moût, la capacité de la levure inactivée, à libérer le GSH dans le milieu est également un critère important. Par conséquent, voici les critères déterminant la qualité d'une levure inactivée spécifique riche en GSH sont:

- Contenu en « GSH véritable »
- le GSH doit être libéré rapidement dans le milieu
- le GSH doit être sous sa forme soluble et réduite → à savoir la seule forme active et efficace en ce qui concerne les mécanismes d'oxydation

### Il faut prendre en considération certains paramètres lors de l'utilisation de LIS riche en GSH.

#### Paramètre de l'azote alimentant la levure :

Le GSH étant un tripeptide, c'est une source d'azote pour la levure. Ainsi, en cas d'épuisement de l'azote du moût, la levure peut utiliser le GSH comme source nutritionnelle. Il est donc très important de bien gérer la fermentation et de fournir une alimentation équilibrée suffisante en azote pour éviter la perte de GSH occasionnée par le prélèvement de GSH en tant que source d'azote par la levure. C'est d'autant plus important si la levure sélectionnée est connue pour ses besoins élevés en azote. Dans ce cas, il faut suivre un contrôle attentif de la fermentation alcoolique.

#### Moment d'ajout :

Le moment d'ajout de LIS riche en GSH a également son importance. Selon différentes études d'Aguera *et al.* (2012) et de Kritzinger *et al.* (2012), ce sont les premières étapes de la fermentation alcoolique qui constituent le meilleur moment pour l'ajout d'un outil tel qu'OptiMUM White®, qui possède la teneur la plus élevée en GSH. On développera davantage cette problématique dans la Parole d'Expert.

## LES RÉSULTATS

### PARTIE

### 1

## CONNAÎTRE LE NIVEAU DE GSH DANS LES LEVURES INACTIVÉES SPÉCIFIQUES (LIS)

### Wessel du Toit



Wessel du Toit, docteur en œnologie, du département de viticulture et œnologie de l'Université de Stellenbosch, fait des recherches sur les antioxydants du vin et l'oxydation dans le vin. Il a travaillé en étroite collaboration avec Lallemand par le passé. Il a publié plusieurs articles sur l'effet de l'oxygène dans le vin et enseigne également sur ce thème en œnologie.

### UN MOT DE NOTRE EXPERT

Les LIS riches en GSH sont des outils intéressants pour fournir du glutathion dans le moût afin de prévenir l'oxydation. Les études sur ce sujet ainsi que nos propres recherches ont montré des différences entre les différentes LIS sur les quantités libérées de GSH.

Ces différences semblent être liées aux divers processus de fabrication des préparations. Nos résultats illustrent les variations entre les différentes LIS riches en GSH en termes de teneur en GSH. De plus, ils montrent combien il est important de distinguer le GSH et la teneur totale en GSH, puisque c'est la forme réduite qui est active en tant qu'antioxydant dans le vin.

On peut déduire de ces données que le processus de production de LIS-GSH-5 (OptiMUM White®) est optimisé à un tel point qu'il possède une teneur en GSH particulièrement élevée. Ce produit pourrait être plus efficace en termes de protection contre l'oxydation dans les vins que les autres LIS-GSH de l'étude. »

## LES RÉSULTATS (PARTIE 1)

De nombreux produits disponibles sur le marché prétendent être riches en GSH. Qu'est-ce que cela veut vraiment dire? Est-ce que l'on parle toujours de la même chose?

Il est important de comprendre que la valeur associée à différentes LIS riches en GSH dépend de la manière dont on mesure la teneur en GSH. Si on la mesure par la classique réaction chimique, on quantifiera alors toutes les molécules ayant un groupement -SH libérées par la LIS, et non pas spécifiquement le GSH sous sa forme réduite. Le résultat s'exprime en termes d'« **équivalent GSH** » et non de « **GSH véritable** ».

La meilleure façon d'obtenir une mesure réelle du glutathion **véritable** consiste à utiliser une méthode spécifique HPLC/UPLC qui révélera la teneur en GSH réduit qui est, comme nous l'avons expliqué ci-dessus, la forme active de GSH pour la préservation de la couleur et de l'arôme du moût et du vin. Parallèlement, on peut mesurer précisément le glutathion oxydé (GSSG) et les autres composés tels que la cystéine et la glutamylcystéine. On peut voir les résultats que donne cette méthode en figure 3. C'est la méthode qui est utilisée pour mesurer le GSH dans l'ensemble des LIS riches en GSH comme OptiMUM White®.

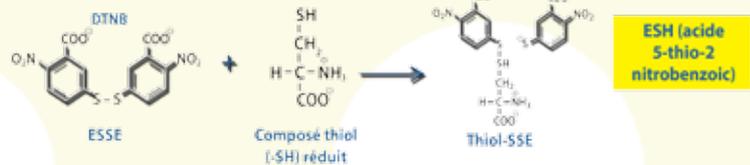


Figure 2. Réaction chimique impliquée dans la détermination chimique classique d'« équivalent GSH » dans les LIS riches en GSH

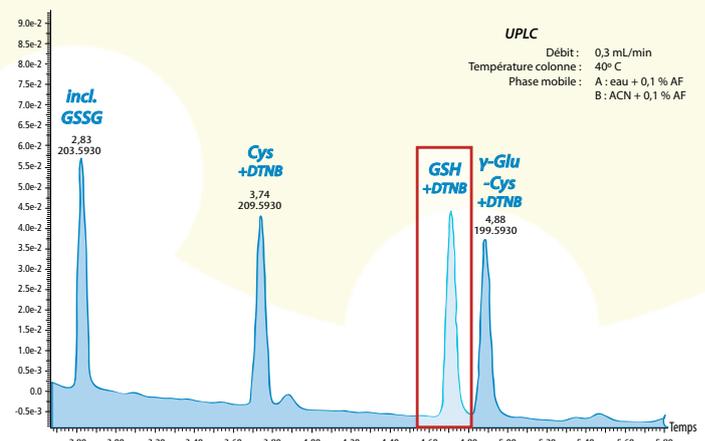


Figure 3. Exemple de chromatogramme par UPLC

La figure 4 montre les résultats de plusieurs analyses de LIS riches en GSH et les variations entre les différentes méthodes d'analyse. L'utilisation de la méthode chimique classique, par exemple (qui mesure l'ensemble des molécules -SH et non pas seulement le GSH réduit actif), donne une interprétation différente. A et OptiWhite® présentent le même profil en termes de teneur en GSH, tandis qu'OptiMUM White®, compte tenu de l'optimisation de son processus de fabrication, présente, et de loin, la plus haute teneur en GSH véritable, ce qui signifie donc que ce produit sera le plus efficace en termes de préservation de la couleur et de l'arôme du moût et du vin.

On peut également noter que le produit Y a la plus haute teneur en « équivalent GSH », mais que c'est aussi celui qui a la plus haute teneur en cystéine, ce qui n'en fera peut-être pas le composé le plus intéressant et le plus approprié compte tenu de son impact sur la qualité du vin.

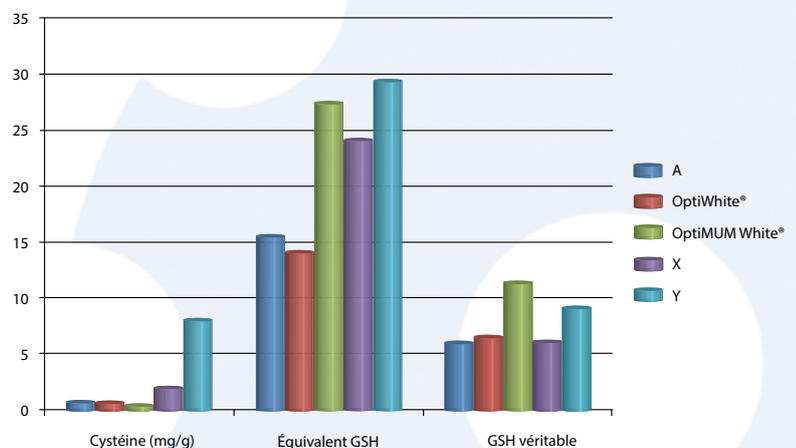


Figure 4. Analyse de la cystéine et du GSH (HPLC), et de l'équivalent GSH (méthode chimique classique) de quelques LIS riches en GSH

## LES RÉSULTATS (PARTIE 1)

Au cours d'une étude réalisée par le département de viticulture et d'œnologie de l'Université de Stellenbosch (Kritzinger *et al.*, 2012), une analyse UPLC a révélé les teneurs en GSH total, réduit et oxydé libérés dans une solution modèle-vin par ces différentes LIS riches en GSH.

Nous constatons d'après la figure 5 que l'OptiMUM White® a libéré, et de loin, la quantité la plus élevée de GSH réduit dans la solution modèle-vin. Les quatre autres produits ont libéré des quantités similaires de GSH réduit dans la solution. Bien que l'un des trois autres produits (produit 3) ait libéré une quantité élevée de GSH total, la plus grande partie de ce GSH est présente sous sa forme oxydée (GSSG), qui n'est pas efficace dans le moût et le vin. Ces résultats montrent clairement qu'OptiMUM White® a libéré la quantité la plus élevée de glutathion nécessaire à la préservation de la qualité du vin.

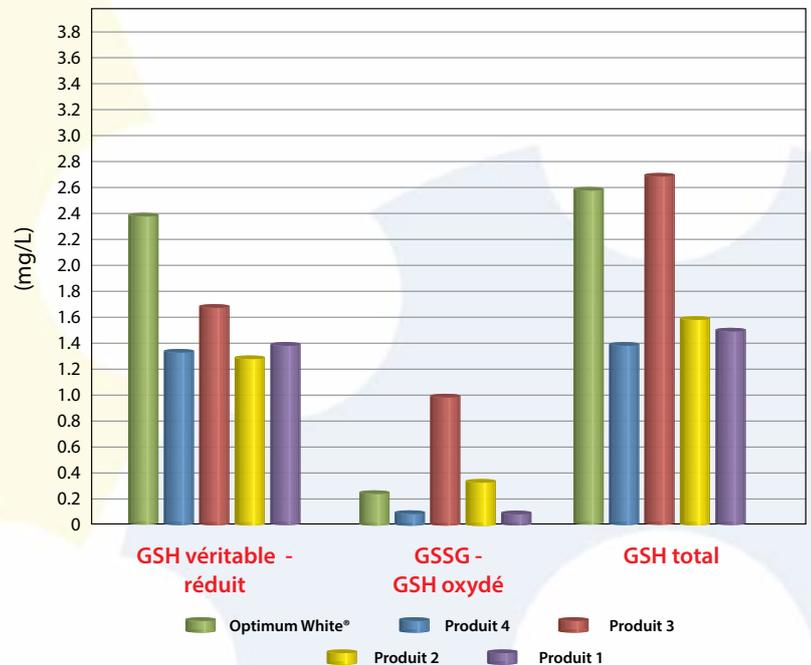


Figure 5. Teneur en glutathion réduit (GSH), oxydé (GSSG) et total (GSH réduit + oxydé) libéré par différentes LIS riches en GSH dans une solution modèle-vin.

## PARTIE

## 2

## LES CONSÉQUENCES DES LIS-GSH SUR LA QUALITÉ DU VIN

## Jean-Michel Salmon



Jean-Michel SALMON, 54 ans, a suivi un parcours universitaire classique avec un diplôme de maîtrise en sciences spécialisée en biochimie industrielle et alimentaire (Université ENSIA, Paris VII, 1981). Après un doctorat en microbiologie obtenu en 1986 (Université de Montpellier), et un séjour postdoctoral d'une année au CSIC à Madrid (laboratoire de C. Gancedo), il a rejoint l'équipe de recherche en microbiologie de l'INRA de Montpellier en tant que chercheur. Il est directeur de recherche auprès de l'Institut depuis 2003 et en charge depuis deux ans de la direction

de l'unité expérimentale Pech-Rouge de l'INRA. Son principal thème de recherche concernait la physiologie des levures (*Saccharomyces cerevisiae*), plus précisément l'étude de ses interactions avec l'oxygène pendant la fermentation alcoolique et le vieillissement du vin. Il a par ailleurs développé une connaissance pratique de l'utilisation de cultures mélangées de levures pendant la fermentation alcoolique. Sa contribution scientifique comporte de 76 articles évalués par des pairs, de 38 articles professionnels liés au vin, de 10 chapitres publiés dans des livres, de 50 conférences internationales, de 37 affiches de congrès et de 4 brevets.

## UN MOT DE NOTRE EXPERT

Nous avons réalisé des travaux de recherche dans le cadre du développement de l'utilisation de LIS riches en GSH en vinification. Plus précisément, nous nous sommes concentrés sur la détermination du meilleur moment d'ajout des produits et sur l'impact d'une telle pratique sur les thiols et sur d'autres composés aromatiques.

Nos résultats montrent l'impact positif de l'ajout de LIS riches en GSH sur la stabilité de couleur et la préservation des thiols volatiles au cours du vieillissement, à condition que cet ajout ait lieu au début de la fermentation alcoolique. On peut aussi remarquer que l'efficacité du traitement est d'autant plus importante que la fermentation alcoolique est bien gérée en termes de choix de levures et d'aspects nutritionnels (Aguera *et al.*, 2012).

## LES RÉSULTATS (PARTIE 2)

## 2.1 Gestion de la fermentation

Comme nous l'avons indiqué plus haut, il est primordial de bien gérer la fermentation lorsqu'on utilise des LIS riches en GSH comme OptiMUM White®, car les levures ayant un besoin élevé en azote peuvent utiliser les acides aminés de LIS riches en GSH comme source d'azote, et ainsi diminuer l'impact de la levure inactivée libérant le GSH dans le vin. Les résultats de la figure 6 (Aguera et al, 2012) montrent l'impact de l'ajout d'OptiMUM White® dans des rosés de Syrah et Grenache; on constate que dans le cas de la levure B, qui a un fort besoin en azote, l'ajout d'OptiMUM White® a l'impact le plus faible sur le niveau de thiols détectés dans le vin par rapport au témoin. Dans le cas des autres levures, qui ont un besoin faible à moyen en azote, l'ajout d'OptiMUM White® est plus important sur la concentration de thiols détectés dans le vin par rapport au vin témoin.

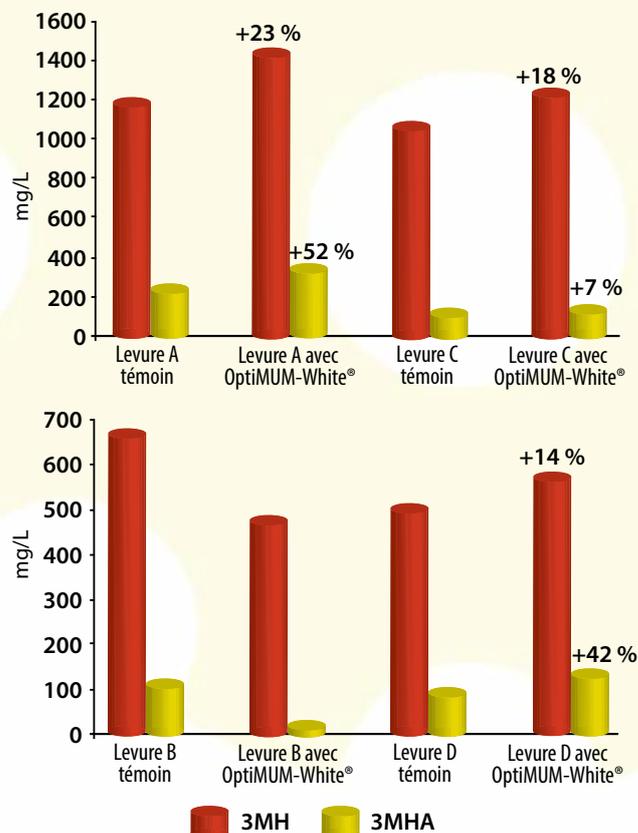


Figure 6. Niveau de thiols dans des vins rosés Syrah (haut) et Grenache (bas) avec et sans ajout de LIS riches en GSH (OptiMUM White®)

## 2.2 Moment de l'ajout

Une étude réalisée par Aguera et al. (2012) a analysé l'impact du moment d'ajout de LIS riches en GSH. OptiMUM White® a été ajouté au cours du levurage, au début de la fermentation (après 43 h de FA) et à la fin. Les résultats (figure 7) ont montré qu'au cours d'un vieillissement accéléré, un impact positif sur la préservation des thiols a été constaté lorsqu'OptiMUM White® a été ajouté au début de la fermentation. Des essais complémentaires ont été effectués sur des vins rosés Grenache et Syrah en cave. Après un an de vieillissement, les vins ont été analysés et des gains significatifs de thiols variétaux (3MH et 3MHA) ont été constatés de nouveau lorsque OptiMUM White® était ajouté au début de la fermentation.

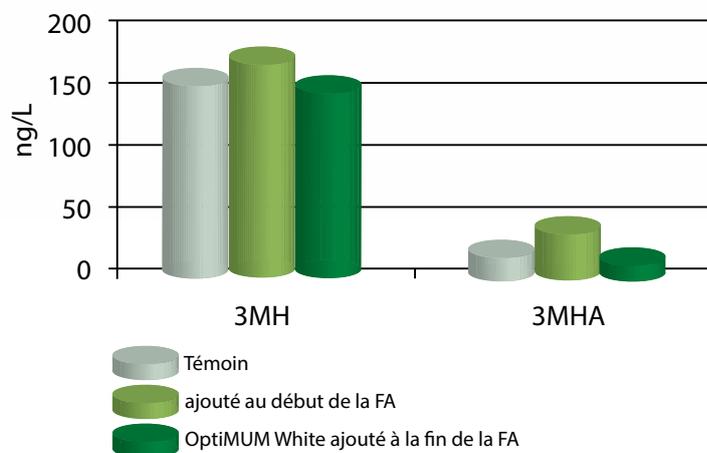


Figure 7. Niveau de thiols dans un Sauvignon blanc exposé à un vieillissement oxydatif accéléré simulé, après un traitement à l'OptiMUM White® avec différents moments d'ajout.

## LES RÉSULTATS (PARTIE 2)

## 2.3 L'impact sur les arômes

De nombreuses études ont montré l'impact du glutathion sur divers arômes tels que les terpènes, les esters et les thiols naturellement volatiles (Fragasso *et al.* 2010, Andújar-Ortiz *et al.* 2010, Curtin, 2009). Certains résultats sont présentés en figure 8, où différents composés aromatiques (esters et terpènes) ont été mesurés dans des vins de cépage Roupeiro et Rabo de Ovelha (Portugal) traités avec un OptiWhite® et OptiMUM White®, et comparés à un témoin. Les vins traités avec OptiMUM White® présentaient une variété d'esters et de terpènes significativement plus grande par rapport à la fois au témoin et au vin traité avec le OptiWhite®.

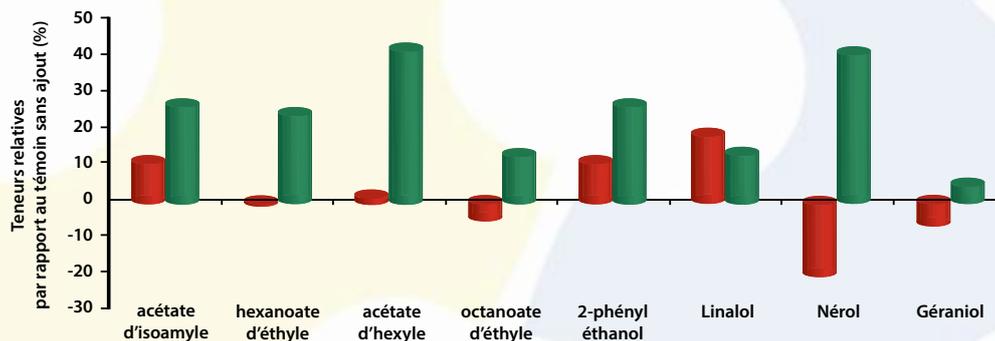


Figure 8. Analyse des variations (%) de composés aromatiques issus de vins de cépage Roupeiro et Rabo de Ovelha (Portugal) traités avec OptiWhite® (en rouge) et OptiMUM White® (en vert) comparé au témoin sans ajout (tiré d'Aguera *et coll.* 2012).

Ces différences dans la composition des composés aromatiques ont eu un impact sensoriel (résultats non-publiés) où le même vin traité avec OptiMUM White® présentait des arômes et un équilibre gustatif significativement plus positifs.

## 2.4. L'impact sur la longévité des arômes

Le fait qu'OptiMUM White® contienne des niveaux élevés de GSH dans sa forme la plus active se reflète dans les résultats obtenus avec ce produit sur les vins, en particulier en termes de longévité. Par exemple, la figure 9 présente les résultats d'un essai réalisé sur du Sauvignon blanc français, où les vins présentent, après un an de vieillissement, des niveaux plus élevés de thiols aromatiques tels que le 3-mercaptohexanol (3MH) et son acétate (3MHA) par rapport au témoin qui n'a pas été traité avec des LIS riches en GSH.

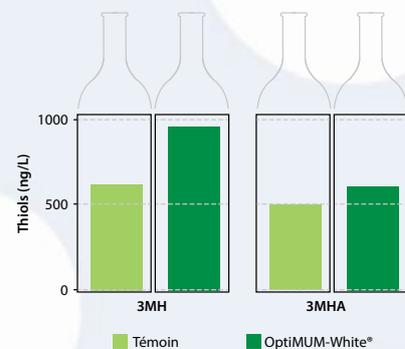


Figure 9. Niveaux de thiols (3MH et 3MHA) dans un Sauvignon blanc traité avec OptiMUM White® un an après la mise en bouteille.

## RÉSUMÉ RAPIDE

Les LIS riches en GSH sont des outils de vinification naturels pouvant être utilisés pour favoriser et améliorer l'intensité aromatique et la longévité ainsi que pour protéger la couleur des vins blancs et rosés. OptiMUM White® est une nouvelle levure inactivée spécifique riche en glutathion qui bénéficie d'un nouveau processus de production optimisé favorisant la disponibilité du glutathion réduit. Le produit contient le niveau le plus élevé d'une forme réellement active et efficace (forme réduite) de GSH. Ce produit aura un impact positif sur la couleur du vin, sa teneur en thiols, sur les esters et terpènes, ainsi que sur les propriétés sensorielles du vin, la préservation des composés aromatiques au cours de l'oxydation et la longévité au cours du vieillissement.

Le prochain Parole d'Expert : La co-inoculation avec les bactéries oenologiques



Available on the App Store