

INFLUENCE DE L'ETAPE DE CROISSANCE ET DE LA QUANTITE DE *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* SUR LA PRODUCTION D'ETHYL-PHENOLS

SALAMEH D.^{(1),(2)}, BRANDAM C.⁽¹⁾, MEDAWAR W.⁽²⁾, LTEIF R.⁽²⁾, STREHAIANO P.⁽¹⁾

(1) Laboratoire de Génie Chimique – 5 Rue Paulin Talabot – 31106 Toulouse - France

(2) Université Saint-Joseph – Beyrouth – Liban

Contact : Cedric.Brandam@ensiacet.fr

Introduction

Depuis quelques années, il est communément admis que la présence de molécules d'éthylphénols dans les vins est associée à la perception de défauts organoleptiques tels que des odeurs d'écurie ou de sueur de cheval (1,2). La production de ces molécules a lieu essentiellement durant l'étape post-fermentaire. Elle est imputée à l'action des levures *Brettanomyces* qui seraient les seules, dans les conditions œnologiques, à exprimer les deux activités enzymatiques (hydroxycinnamate decarboxylase et vinylphénol reductase) nécessaires pour la transformation de l'acide p-coumarique naturellement présent dans les moûts en vinylphénol puis en éthylphénol (3,4). Les pertes économiques dues à l'action de ces levures contaminantes étant non négligeables, les recherches sur ce sujet se sont multipliées ces dernières années. Dans ce cadre, nos travaux s'intéressent à la compréhension de cette transformation en étudiant plus particulièrement ses aspects cinétiques. Ici, nous présentons les résultats d'expérimentations menées sur l'influence de l'état physiologique et du niveau de population d'une souche *B. bruxellensis* sur la disparition de l'acide p-coumarique et la production des éthylphénols.

- **Matériels et Méthodes**

Trois séries de fermentations ont été conduites en erlenmeyers de 500ml, agités, à la température de 30°C, dans un milieu synthétique mimant un vin. Dans ces fermentations, 10 mg/L d'acide p-coumarique ont été ajoutés soit en début de phase de latence (au moment de l'inoculation des *Brettanomyces*), soit en début de phase exponentielle de croissance, soit en début de la phase stationnaire. Par ailleurs, une population de *Brettanomyces* en phase stationnaire a été lavée et remise en solution dans un tampon phosphate-citrate à pH 3.5. Il a été vérifié que ces conditions maintenaient l'intégrité des cellules. Quatre concentrations cellulaires différentes ont pu ainsi être testées 10^4 - 10^5 - 10^7 - 10^8 cell/ml. 10mg/L d'acide p-coumarique ont alors été ajoutés. Pour ces deux séries d'expériences, les cinétiques d'apparition des éthylphénols par GC-MS et de disparition d'acide coumarique par HPLC-UV ont été suivies.

- **Influence de l'étape de croissance sur la bioconversion**

Pour la première série d'expériences, dans tous les cas nous retrouvons au final une mole d'éthylphénol produite pour une mole d'acide p-coumarique disparue et la totalité des 10mg/L ont été consommés. La production d'éthylphénols est donc la seule voie d'utilisation de l'acide p-coumarique. Par contre, les vitesses spécifiques de consommation de l'acide p-coumarique et de production des éthylphénols sont différentes suivant les étapes de croissance (figure 1). Ces vitesses traduisent la capacité d'une cellule à consommer rapidement l'acide p-coumarique ou produire rapidement les éthylphénols. Les valeurs maximales de ces vitesses sont observées en phase de latence pour la disparition du coumarate mais en phase stationnaire pour l'apparition des éthylphénols. Ceci laisse penser que le vinylphénol, l'intermédiaire réactionnel, s'accumule avant d'être transformé en éthylphénol. Cette accumulation est maximale lors de l'ajout en phase de

latence puisque l'écart entre les vitesses de disparition et d'apparition est maximal lors de cette expérience.

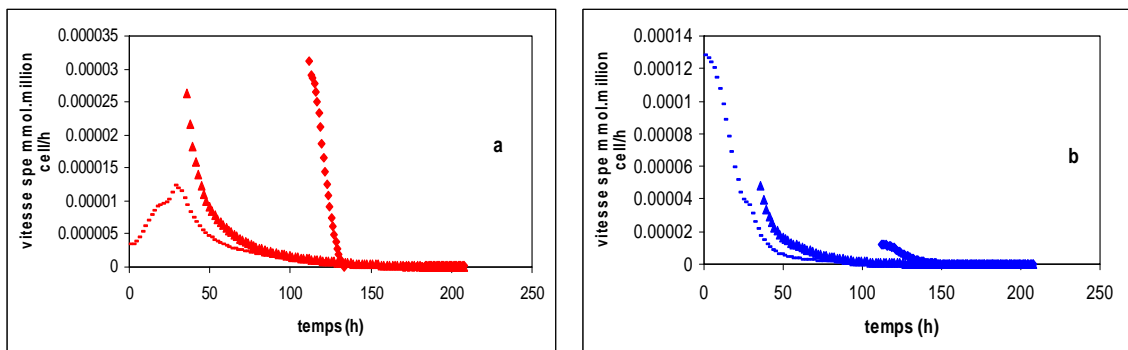


Figure 1 – vitesses spécifiques d'apparition des éthylphénols (a) et de consommation du p-coumarique (b) en fonction des phases de croissance : (-) latence, (▲) exponentielle, (◆) stationnaire

- **Influence du niveau de population sur la bioconversion**

D'autre part, pour la seconde série de fermentation où la bioconversion a été étudiée avec des niveaux de population différents mais dans des états physiologiques identiques (phase stationnaire), il apparaît également que la bioconversion est équimolaire entre l'acide coumarique et les éthylphénols. Par contre, les vitesses d'apparition des éthylphénols sont directement liées aux quantités de levures présentes (tableau 1) ce qui signifie que les vitesses spécifiques moyennes de ces expériences sont du même ordre. Ces travaux confirment les résultats de Renouf (2006) montrant que la quantité d'éthylphénols produite dans un vin est proportionnelle à la durée d'activité des levures *Brettanomyces* et à leur nombre. Cela signifie aussi, que si un vin est contaminé, même par de très faibles quantités de *Brettanomyces*, le coumarate présent finira par être totalement transformé en éthylphénols.

Population 10 ⁴ cell/ml	Vitesse de production d'éthylphénol mmol/l/h
1	6,75.10 ⁻⁰⁸
10	1,81.10 ⁻⁰⁷
1000	4,44.10 ⁻⁰⁵
10000	2,63.10 ⁻⁰⁴

Tableau 1 – Vitesse de production d'éthylphénols en fonction de la population de *B. bruxellensis*

• Conclusion

Dans ces travaux, nous avons montré que quel que soit l'état physiologique et le niveau de population de la levure *Brettanomyces bruxellensis* la bioconversion de l'acide p-coumarique en éthylphénol a lieu de façon totale et équimolaire. Par contre, état physiologique et niveau de population sont des facteurs influant sur la cinétique de cette réaction. Dans les conditions testées, la vitesse d'apparition des éthylphénols apparaît directement proportionnelle au niveau de population. En ce qui concerne l'état physiologique, nos constatations montrent qu'il a un effet sur la cinétique de bioconversion mais les mécanismes impliqués sont encore à l'étude.

Références bibliographiques

1. Etievant, P.X. (1981). *Journal of agricultural and food chemistry* 29: 65-67.
2. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., and Pons, M. (1992). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60: 165-178.
3. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N. (1995). *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 463-468.
4. Dugelay, I., Guntata, Z., Sapis, J.C., Beaumes, R., Bayonove, C., (1993). *Journal of agricultural and Food Chemistry* 41: 2092-2096.
5. Renouf V. (2006) Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse