

# Peut-on contrôler le développement de *Brettanomyces* dans le vin ?

24

**RÉSUMÉ** Ce travail a porté sur l'étude du comportement « d'une souche » de levure *Brettanomyces bruxellensis* vis-à-vis de la variation de paramètres physico/chimiques du vin afin de développer un outil de diagnostic pour la prévention du caractère phénolé dans les vins de la Vallée du Rhône.

En s'appuyant sur la méthodologie des surfaces de réponse, l'influence de différents facteurs sur le développement de la levure *Brettanomyces* et sa production d'éthylphénols a été étudiée après 56 jours d'incubation : pH, température, titre alcoolémique volumétrique, concentration en SO<sub>2</sub> actif, concentration en sucres, concentration en lies. La culture des levures selon les différentes modalités obtenues par le plan d'expérience ont été réalisées avec une souche de levure *Brettanomyces* dans du vin synthétique. Un modèle mathématique établi grâce au logiciel JMP® a permis de mesurer l'influence de chacun des facteurs ainsi que de leurs interactions sur ces deux réponses. Les facteurs concentration en SO<sub>2</sub> actif, température, lies et taux alcoolique volumétrique ont un effet très significatif sur l'évolution de la population des levures et la production de phénols.

Le modèle mathématique obtenu grâce à ces résultats permettra de développer un outil informatique qui, une fois mis en place, sera d'une grande utilité aux vignerons dans la lutte du risque *Brettanomyces* et dans la prévention de son développement

## MOTS CLÉS

*BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*,  
ÉTHYLPHÉNOLS, LEVURE, DIAGNOSTIC

**ABSTRACT** This work focused on studying the behavior of a *Brettanomyces bruxellensis* yeast strain toward changes in physicochemical parameters in red wine, in order to develop a diagnostic tool for the prevention of phenolic character in wines produced in Rhone Valley.

Based on the Response Surface Methodology (RSM), the influence of various factors on the development of *Brettanomyces* yeast and its production of volatile phenols was investigated after 56 days of incubation: pH, temperature, ethanol, active SO<sub>2</sub>, sugar concentration, lies concentration. Yeast culture for different medium terms obtained by the experimental Box-Behnken design were performed on the wine *Brettanomyces bruxellensis* strain BR-17 in model wine. Mathematical equations established through the JMP software was used to measure the influence of each factor and their interactions on growth and ethyl phenolic production. Factors, active SO<sub>2</sub>, temperature, ethanol and lees rates have a significant effect on the evolution of the population of yeasts and production of phenols.

The mathematical model obtained through these results will help us to develop a computer tool which, once implemented, will be of great benefit to the tenants in the struggle of *Brettanomyces* risk and in preventing its development.

## KEYWORDS

*BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*,  
ETHYLPHENOLS, YEAST, DIAGNOSTIC

Mohand SADOUDI\*  
Adrien VALINGOT  
Virginie SERPAGGI  
Pauline GILLINO  
Patrick VUCHOT  
Inter Rhône  
2260 route du grès  
84100 orange

\*Auteur correspondant  
msadoudi@inter-rhone.com  
04 90 11 46 22



Mohand SADOUDI

## Could we control the development of *Brettanomyces* yeast in wine ?



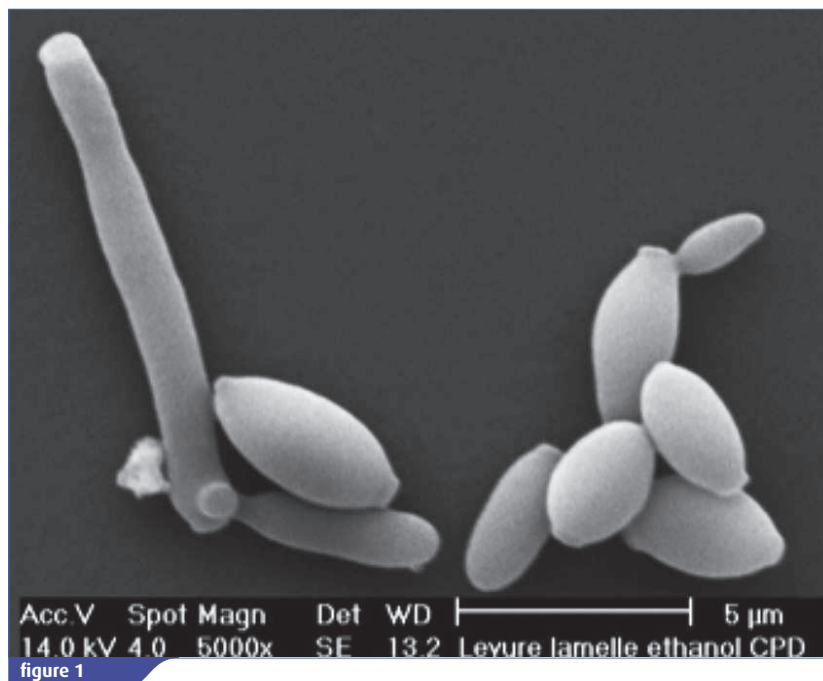
**L**a levure *Brettanomyces* est une levure de contamination, majoritairement rencontrée dans les vins rouges, qui en produisant des phénols volatils à partir de composés naturellement présents dans le raisin, donne au vin des arômes désagréables caractérisés par les termes «sueur de cheval» ou encore «d'écurie» (Chattonnet *et al.*, 1992). Ces arômes conduisent à des vins dont les qualités organoleptiques sont altérées, entraînant un rejet du consommateur. La simple présence de *Brettanomyces* est associée fortement au risque d'observer une production non maîtrisée de phénols volatils. A ce jour, les études menées pour essayer de connaître les causes de contamination sont insuffisantes et parfois contradictoires. Ainsi, la compréhension des conditions de croissance ainsi que de la

production de phénols volatils est indispensable pour pouvoir maîtriser et/ou lutter contre cette levure. Cette étude a donc pour objectif l'étude de l'impact des paramètres environnementaux sur la cinétique de croissance et le métabolisme de *Brettanomyces* et la modélisation de la croissance et de la production de phénols volatils.

### • La levure *Brettanomyces* en bref

Connue depuis 1904, les levures *Brettanomyces* ont été mises en évidence dans la plupart des boissons fermentées comme la bière, le cidre et le vin, et identifiées comme responsables de l'apparition du caractère phénolé.

*Brettanomyces* est une levure polymorphe dont la taille et la forme peuvent varier considérablement selon son environnement et son



*B. bruxellensis* au microscope électronique à balayage (x5000) (Serpaggi *et al.*, 2012)

état physiologique. Elle peut être sous forme ogivale, cylindrique, ellipsoïdale ou sphérique. Elle est plus petite que *Saccharomyces* mais facilement observable au microscope (figure 1). On peut la retrouver sous forme de petites cellules isolées de  $(2,0-7,0) \times (3,5-22,0) \mu\text{m}$ , en paires ou en chaînettes de 3 à 5 cellules rappelant parfois un pseudo mycélium non septé (Barbin, 2006; Serpaggi *et al.*, 2012). En milieu solide, les colonies sont de petite taille, ont un aspect lisse et brillant, de couleur crème qui tend à brunir avec le vieillissement des cellules. La reproduction de *Brettanomyces* se fait par bourgeonnement multipolaire, laissant des cicatrices de bourgeonnement très typiques. D'un point de vue génomique, *S. cerevisiae* et *Candida albicans* sont les levures les plus proches de *Brettanomyces*.

### • Origines de la levure *Brettanomyces* dans le vin

Tracer l'itinéraire que suit cette levure pour la contamination d'un vin est encore aujourd'hui confus et très complexe. La contamination, provient-elle du raisin, du chai ou du matériel vinaire ? Les avis sont partagés à ce sujet mais en tous cas, différentes origines de *Brettanomyces* sont possibles.

### → Le raisin

Le bond géant dans le développement des méthodes d'analyse des microorganismes a permis de mettre en évidence la présence du genre *Brettanomyces* sur le raisin, contrairement aux anciennes croyances. En effet, Renouf (2006) a démontré la présence de *B. bruxellensis* à différents stades de maturité des baies, en précisant l'intérêt d'un enrichissement lors de la procédure d'isolement afin d'éviter les sous-évaluations de leur présence.

### → Le chai

La levure *Brettanomyces* trouve souvent refuge dans le chai. Elle peut être présente sur les murs et le sol, surtout lorsque les endroits sont confinés. Elle peut s'installer également sur le matériel vinaire comme les cuves, les pompes, les tuyaux, les lignes d'embouteillage et les barriques qui sont sans doute leur foyer de prédilection. En effet, d'une part, le bois de par sa nature poreuse offre un lieu confortable contre les agressions extérieures et d'autre part, *Brettanomyces* possède une activité enzymatique  $\beta$ -glucosidase laquelle lui permet de dégrader les sucres naturels du bois (par exemple : cellobiose) pour en faire une source d'énergie. Il faut toutefois noter que, la barrique « neuve » n'est pas une source écologique de propagation de *Brettanomyces* mais elle constitue un environnement favorable, dans lequel cette levure peut se loger pendant plusieurs années à condition que celle-ci ait préalablement contenu du vin contaminé.

L'ambiance du chai peut également abriter des *Brettanomyces* comme le rapportent Connel *et al.* (2002) en mettant en évidence la présence des *Brettanomyces* dans l'air prélevé du chai.

### → Agents de dissémination

Le rôle de certains insectes tels que les abeilles, les guêpes et les drosophiles présentes dans le vignoble et le chai ont été décrit comme pouvant influencer la présence de levures sur le raisin et dans différents endroits de la cave (Stefanini *et al.*, 2012). Ces insectes au contact avec le raisin ou le matériel vinaire favorisent l'adhésion des levures au niveau de leurs téguments permettant ainsi aux levures d'être disséminées. Van Der Walt et Van Kerkan (1959) ont identifié des



espèces de *Brettanomyces* à partir des drosophiles présentes dans l'environnement de la cave. Le vent dans le vignoble et les courants d'air dans la cave sont des agents non négligeables quant à la dissémination de ces levures.

#### • Besoins nutritionnels

##### → Sources de carbone

Grâce à son métabolisme complexe, *Brettanomyces* peut puiser son énergie à partir de différents substrats carbonés. Cette levure est capable de dégrader différents sucres simples comme le glucose, fructose, galactose, mannose et certains disaccharides comme le saccharose, tréhalose ou encore le cellobiose, un constituant du bois des barriques. Pour se multiplier, *Brettanomyces* n'a besoin que de très faibles quantités de sucres, <0,3 g/L (Chatonnet *et al.*, 1995).

##### → Source d'azote

Comme tout organisme vivant, l'azote est vital pour *Brettanomyces*, qu'il soit sous forme organique ou inorganique. Pour la forme inorganique, plusieurs souches sont capables d'assimiler nitrates et nitrites comme seules sources d'azote grâce à des réductases spécifiques, qui sont toutefois inhibées en présence d'ammonium, un ion souvent retrouvé en milieu de culture. Des études ont cependant montré un effet inhibiteur de l'ammonium sur la croissance pour une concentration en sulfate d'ammonium de 2 g/L. L'azote organique apporté par des extraits de levures semble avoir un impact important sur la croissance. En effet, l'extrait de levure contient des acides aminés et d'autres formes d'azote organique, ainsi que des oligoéléments comme le magnésium et le phosphate (Serpaggi *et al.* 2012). Cependant, la quantité d'extrait de levures nécessaire au développement de *Brettanomyces* est minime et montre encore une fois les faibles besoins nutritionnels de cette levure.

#### • Effet des facteurs physicochimiques sur la croissance de *Brettanomyces* et la production de phénols

Le vin étant un milieu complexe, plusieurs facteurs physicochimiques ont un impact sur la croissance de *Brettanomyces* mais aussi sur la production des phénols volatils.

##### → Ethanol

Plusieurs études ont été menées afin de démontrer la résistance de *Brettanomyces* à de fortes concentrations en éthanol. Ainsi, une étude a mis en évidence la résistance d'une trentaine de souches de *Brettanomyces* à des teneurs supérieures à 13,5 % (v/v) en milieu synthétique et en vin (Barata, *et al.*, 2008).

Même si le taux de croissance et le rendement en biomasse sont fortement diminués par la présence d'éthanol, la levure *Brettanomyces* présente une forte tolérance à des concentrations relativement élevées.

##### → pH

De nombreuses études convergentes ont démontré que les pH couramment rencontrés en œnologie n'ont pas d'impact sur la multiplication de *Brettanomyces*. En effet, Gillis (2009) a démontré que la croissance de *Brettanomyces* était possible en jus de raisin pour des pH compris entre 2,6 et 4,5. En 2004, Silva *et al.* ont eux déterminé un taux de croissance spécifique inchangé entre pH 3,5 et pH 4,5. Enfin, l'étude de Conterno *et al.* (2009) a mis en évidence la résistance de *B. bruxellensis* au pH bas. En effet, 33 souches de diverses origines étaient capables de se développer à pH 2,0.

##### → Température

De manière générale, la température optimale de culture pour les levures est comprise entre 25 et 30°C. Pour *Brettanomyces*, celle-ci se situe aux alentours de 28°C. Ainsi, une température trop basse induit une phase de latence beaucoup plus longue et une température trop élevée va réduire cette phase de latence mais va aussi diminuer la viabilité cellulaire (Dias *et al.*, 2003).

##### → Oxygène

L'oxygène stimule la croissance de *Brettanomyces* durant la fermentation alcoolique. La levure peut donc se multiplier quatre fois plus vite qu'en anaérobiose. En effet, en condition d'anaérobiose, c'est-à-dire en absence d'oxygène, le glucose n'est consommé qu'après une phase de latence longue. Ainsi, en présence d'oxygène sur un milieu riche en glucose, il a été observé trois phases de croissances différentes. Une première

# Peut-on contrôler le développement de *Brettanomyces* dans le vin ?

Facteur	Niveau bas	Niveau intermédiaire	Niveau haut
pH	3,5	3,75	4
Température (°C)	10	17	24
T. A.V. (% vol)	12	14	16
Sucres (g/L)	0,5	3,25	6
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	0	0,3	0,6
Lies (g/L)	0	5	10

tableau 1

Codes des facteurs expérimentaux et leurs niveaux.

phase durant laquelle *Brettanomyces* consomme le glucose et se multiplie. Lors de cette phase, elle produit alors de l'éthanol et de l'acide acétique en quantité égale. Ce n'est que lorsque le glucose est totalement consommé que la deuxième phase apparaît. Elle consiste en une conversion de l'éthanol en acide acétique sans croissance de la levure. Enfin, la dernière phase est la consommation de l'acide acétique accompagnée d'une reprise de croissance (Wijsman *et al.*, 1984).

## → Précurseurs

La concentration en phénols volatils formée est proportionnelle à la concentration en précurseurs phénoliques. En effet, la quantité de précurseurs phénoliques dépend du cépage et de la maturité du grain de raisin mais aussi de la macération.

## → Sulfites

La concentration en sulfites va diminuer la densité cellulaire et la vitesse de croissance, ce qui va diminuer la production de phénols. Mais, lorsque le SO<sub>2</sub> est présent en faible quantité, ce

dernier a pour effet de faire passer les cellules en état VNC. Les cellules en état VNC produisent encore des phénols mais la production est ralentie.

## → Elevage

Le type d'élevage a une influence sur la production de phénols. En effet, l'élevage en fût de chêne favorise la présence d'éthylphénols par rapport à un élevage en cuve d'acier inoxydable. Le bois accumule les éthylphénols et les *Brettanomyces* au fur et à mesure des élevages. Ainsi, lors des vinifications suivantes dans les mêmes fûts, les phénols et les levures contenues dans le bois peuvent contaminer le vin.

## → Présence des lies

Les lies ont la capacité d'absorber les phénols volatils et ainsi, de corriger le défaut organoleptique (Chassagne *et al.*, 2005). Cet effet est encore plus marqué lorsque les levures sont autolysées et que le milieu est du vin non synthétique. Plus la quantité de lies est grande, plus la quantité de phénols absorbés sera élevée.

L'étude individuelle de ces facteurs reste abordable mais dans des conditions réelles, il y a énormément d'interactions rendant l'interprétation des expériences complexe. La recherche se concentre maintenant sur l'établissement de modèles permettant de décrire les effets des facteurs et de leurs interactions sur le développement de *Brettanomyces* (Chandra *et al.*, 2014; Sturm *et al.*, 2014).

Composition du vin synthétique.

Composé	Quantité (g/L)
Acide malique	3
Acide tartrique	3
Acide citrique	0,3
Acide p-coumarique	0,005
Acide férulique	0,005
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,025
Sulfate de potassium	0,1
Fructose	*
Glucose	*
Ethanol	*
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	*
Lies (g/L)	*
pH	*

\* paramètre variable dans le plan d'expérience

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### • Méthode des surfaces de réponse (MSR)

La MSR est un plan d'expérience (PEX) permettant de déterminer avec un minimum d'essais l'influence de plusieurs facteurs sur une réponse. Autrement dit, il a pour objectif de fournir un maximum d'informations sur une expérience en faisant varier plusieurs facteurs avec un minimum d'essais organisés de manière précise. Cette méthode permet de modéliser des données de manière à pouvoir prédire, par exemple, le taux de croissance d'un microorganisme ou la production d'un composé dans une situation donnée.



Essais	Facteurs						Résultats obtenus	
	pH	T (°C)	SO <sub>2</sub> (mg/L)	TAV (% v/v)	Sucres (g/L)	Lies (g/L)	Population (Log UFC/mL)	EP (µg/L)
1	3,5	12	0,3	13,5	3,5	5	<1,00	0
2	3,5	12	0,3	16	3,5	5	<1,00	0
3	3,5	17	0	14,75	3,5	0	1,48	0
4	3,5	17	0	14,75	3,5	10	6,44	1493,8
5	3,5	17	0,3	13,5	1	5	6,62	1523,7
6	3,5	17	0,3	13,5	6	5	6,85	1474,2
7	3,5	17	0,3	16	1	5	<1,00	0
8	3,5	17	0,3	16	6	5	<1,00	0
9	3,5	17	0,6	14,75	3,5	0	<1,00	0
10	3,5	17	0,6	14,75	3,5	10	<1,00	0
11	3,5	22	0,3	13,5	3,5	5	4,78	1530,1
12	3,5	22	0,3	16	3,5	5	<1,00	0
13	3,75	12	0	14,75	1	5	<1,00	0
14	3,75	12	0	14,75	6	5	<1,00	0
15	3,75	12	0,3	14,75	1	0	<1,00	0
16	3,75	12	0,3	14,75	1	10	<1,00	0
17	3,75	12	0,3	14,75	6	0	<1,00	0
18	3,75	12	0,3	14,75	6	10	<1,00	0
19	3,75	12	0,6	14,75	1	5	<1,00	0
20	3,75	12	0,6	14,75	6	5	<1,00	0
21	3,75	17	0	13,5	3,5	0	4,68	0
22	3,75	17	0	13,5	3,5	10	5,65	1628
23	3,75	17	0	16	3,5	0	<1,00	0
24	3,75	17	0	16	3,5	10	1,78	0
25	3,75	17	0,3	14,75	3,5	5	2,67	0
26	3,75	17	0,3	14,75	3,5	5	<1,00	0
27	3,75	17	0,3	14,75	3,5	5	2,78	0
28	3,75	17	0,3	14,75	3,5	5	3,33	0
29	3,75	17	0,3	14,75	3,5	5	<1,00	0
30	3,75	17	0,3	14,75	3,5	5	<1,00	0
31	3,75	17	0,6	13,5	3,5	0	<1,00	0
32	3,75	17	0,6	13,5	3,5	10	<1,00	0
33	3,75	17	0,6	16	3,5	0	<1,00	0
34	3,75	17	0,6	16	3,5	10	2,30	0
35	3,75	22	0	14,75	1	5	4,56	1142
36	3,75	22	0	14,75	6	5	6,39	1605,1
37	3,75	22	0,3	14,75	1	0	<1,00	0
38	3,75	22	0,3	14,75	1	10	4,99	1216,3
39	3,75	22	0,3	14,75	6	0	<1,00	0
40	3,75	22	0,3	14,75	6	10	6,50	1571,4
41	3,75	22	0,6	14,75	1	5	<1,00	0
42	3,75	22	0,6	14,75	6	5	<1,00	0
43	4	12	0,3	13,5	3,5	5	<1,00	0
44	4	12	0,3	16	3,5	5	<1,00	0
45	4	17	0	14,75	3,5	0	1,85	0
46	4	17	0	14,75	3,5	10	6,74	1415
47	4	17	0,3	13,5	1	5	<1,00	0
48	4	17	0,3	13,5	6	5	<1,00	0
49	4	17	0,3	16	1	5	<1,00	0
50	4	17	0,3	16	6	5	<1,00	0
51	4	17	0,6	14,75	3,5	0	<1,00	0
52	4	17	0,6	14,75	3,5	10	<1,00	0
53	4	22	0,3	13,5	3,5	5	5,81	1395,7
54	4	22	0,3	16	3,5	5	2,30	0

Différentes modalités générées par le modèle Box-Behnken à partir des 6 facteurs à 3 niveaux et les résultats expérimentaux obtenus après 56 jours d'élevage utilisés pour la modélisation.

tableau 3

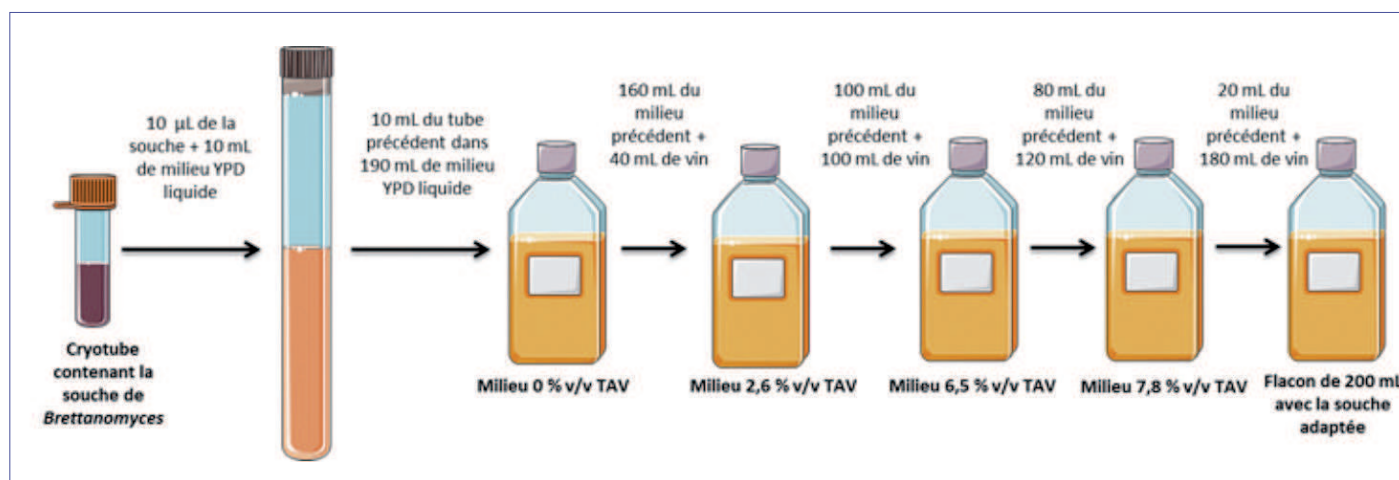


figure 2

Étapes d'adaptation de la souche de *B. bruxellensis* BR17.

Pour cette étude, le plan MSR Box-Behnken a été utilisé à l'aide du logiciel JMP (JMP France, SAS software).

### → Modèle expérimental Box-Behnken

Dans la MSR, la réponse «y» est décrite par une équation polynomiale en fonction de «p» variables indépendantes «xi» :  $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_p) + \epsilon$ .

Où  $\epsilon$  est l'erreur observée pour la réponse y. Généralement, la réponse est bien modélisée par un polynôme du premier ou du second ordre représentant une surface multidimensionnelle (exemple : surface de réponse). Les paramètres de ces équations sont estimés à partir des données expérimentales obtenues en utilisant le principe statistique des moindres carrés (test proposé par le logiciel JMP). Dans les équations du second ordre, les coefficients des termes au carré déterminent la direction de la courbure de la surface de réponse.

Dans cette étude, l'influence de 6 facteurs (variables) mesurables (contrôlables) : pH, Température,  $SO_2$ , Ethanol, Sucres (glucose + fructose) et lies sur la croissance d'une souche de levure de *B. bruxellensis* BR17 et sa production de phénols, lors de l'élevage, a été étudiée en utilisant le modèle de plan d'expérience Box-Behnken. Trois niveaux (-1, 0, +1) ont été testés pour chaque facteur (tableau 1).

Le choix de ce PEX «Box Behncken» a été déterminé par les besoins de l'étude. En effet, ce plan est particulièrement bien adapté pour

les facteurs à 3 niveaux, l'étude de l'impact de chaque facteur ainsi que l'influence de l'interaction entre les facteurs et la modélisation des données. Ce PEX a été construit à l'aide du logiciel JMP (JMP France, SAS software). Un ensemble de 54 modalités (essais) a été généré (tableau 3).

### • Souche de levure utilisée

La souche de levure *B. bruxellensis* BR17 a été isolée dans notre laboratoire à partir d'un vin rouge de cépage Syrah et a été choisie pour sa capacité à tolérer de fortes concentrations en éthanol >15 % v/v. Elle a été conservée dans une solution YPD/Glycérol 40 % (ratio : 1/1) à -80°C.

### • Vin synthétique

Le vin synthétique (VS) utilisé est une solution modèle qui se rapproche le plus possible de la composition d'un vin en fin de fermentation alcoolique (FA). Pour les besoins du plan d'expérience Box-Behnken, une base de VS a été préparée (tableau 2) puis les paramètres variables ont été ajustés pour chacune des 54 modalités.

Le dioxyde de soufre a été ajusté avec du métabisulfite de potassium. Les différentes concentrations d'éthanol souhaitées ont été obtenues par ajout de l'éthanol à 96%. Les valeurs de pH ont été ajustées avec du NaOH concentré. Les lies utilisées dans cette étude ont été générées par fermentation d'un jus de raisin bio sans additifs par une levure sèche active (LSA) de *Sac-*



*Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Rhône 4600, Lallemant). A la fin de la FA, le vin a été centrifugé (7000 rpm) et les lies obtenues ont été inactivées par chauffage à 100°C/30min. Un dénombrement sur milieu gélosé YPD - incubation 48h à 28°C (glucose 20 g/L, peptone 20 g/L, extrait de levure 10 g/L, chloramphénicol 0,2 g/L) a été réalisé pour confirmer l'inactivation totale des lies.

#### • Mise en culture et adaptation de la souche

*B. bruxellensis* BR17 a été cultivée dans 10 mL de milieu YPD à 28°C.

Lorsque la population en cellules viable atteint 107 cellules/mL, une adaptation progressive a été réalisée dans la solution de vin modèle (glucose 0,5 g/L, fructose 0,5 g/L, extrait de levure 0,5 g/L, sulfate de magnésium 0,2 g/L, phosphate de potassium 2 g/L, acide malique L-malique 3 g/L, acide tartarique 5 g/L, éthanol 10 %, pH 3,5 (NaOH concentré), stérilisation par filtration sur membrane 0,22 µm) (figure 2). L'estimation de la concentration de cellules viables a été réalisée par cytométrie en flux avec un double marquage FDA-IP (fluorescéine diacétate - iodure de propidium).

#### • Conditions de culture et suivi de croissance et de production de 4-éthylphénol

Les essais ont été conduits dans des flacons de 500 mL contenant 450 mL de VS. Les 54 flacons ont été ensuite inoculés à raison de 10<sup>3</sup> cellules/mL de la souche de levure BR17 adaptée.

Le suivi des populations et de la production de 4-EP est réalisé de manière hebdomadaire sur 8 semaines d'incubation.

Le suivi de croissance a été réalisé par dénombrement sur milieu gélosé ITV (glucose 20 g/L, peptone 20 g/L, extrait de levure 10 g/L, acide p-couparique 10 mg/L, acide férulique 10 mg/L, vert de bromocrésol 30 mg/L, actidione à 0,25 % 20 mL/L, agar 20 g/L) après 5 jours d'incubation à 28°C.

Les analyses de 4-EP ont été réalisées par GC-MS (Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à une Spectrométrie de Masse) après micro-extraction sur phase solide (SPME) selon le protocole décrit par Monje *et al.* (2002).

#### • Analyses statistiques

Les données de cette étude sont modélisées par une équation de second ordre, laquelle cor-

Croissance des populations de *B. bruxellensis* BR17 au cours du temps (jours) dans les 54 essais.

tableau 4

Essai	Log UFC/mL								
	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J56
E1,E2,E3,E7,E8,E9,E10,E12,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E23,E25,E26,E28,E29,E30,E31,E32,E33,E34,E37,E39,E41,E42,E43,E44,E47,E48,E49,E50,E51,E52,E54	3	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
E4	3	3,77	4,82	5,57	6,62	6,77	6,77	6,66	6,44
E5	3	1,60	3,77	5,57	5,74	6,82	6,60	6,77	6,62
E6	3	1,85	3,44	5,24	5,74	6,95	6,81	6,80	6,85
E11	3	5,58	5,57	6,24	6,27	5,63	5,36	5,14	4,78
E13	3	2,94	2,58	2,36	1,90	1,90	1,30	1,00	<1,00
E14	3	2,87	2,52	2,08	1,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
E21	3	3,47	3,66	4,03	3,97	4,49	4,57	4,76	4,68
E22	3	5,44	5,57	6,08	6,01	6,71	5,81	5,72	5,65
E24	3	2,64	2,00	2,00	1,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
E27	3	<1,00	<1,00	1,30	1,60	1,48	1,78	2,15	2,78
E35	3	4,01	5,32	5,91	6,34	6,08	5,13	4,68	4,56
E36	3	3,81	4,92	5,83	6,17	6,18	6,28	6,26	6,39
E38	3	2,11	2,93	4,16	5,44	5,30	5,57	5,52	4,99
E40	3	2,46	3,66	5,10	5,57	5,74	5,71	6,21	6,50
E45	3	3,08	2,62	2,58	2,59	2,34	2,41	2,26	1,85
E46	3	3,93	5,08	5,57	6,10	6,62	6,81	6,81	6,74
E53	3	1,00	1,30	3,23	5,27	5,74	6,87	6,71	5,81



## Peut-on contrôler le développement de *Brettanomyces* dans le vin ?

Essai	4-Ethylphénol (EP) µg/L								
	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J56
E1,E2,E3,E7,E8,E9,E10,E12,E13,E14,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E21,E23,E24,E25,E26,E27,E28,E29,E30,E31,E32,E33,E34,E37,E39,E41,E42,E43,E44,E45,E47,E48,E49,E50,E51,E52,E54	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E4	nd	nd	nd	nd	314,1	912,2	1376,3	1487,5	1493,8
E5	nd	nd	nd	nd	315	984,3	1380,6	1405	1523,7
E6	nd	nd	nd	nd	276,7	621,7	1143,7	1399,2	1474,2
E11	nd	nd	nd	nd	1283,7	1423,9	1511,8	1515,3	1530,1
E22	nd	nd	nd	1071,3	1412,1	1549	1621,7	1627	1628
E35	nd	nd	158,5	446,1	1061	1127,3	1130	1137,1	1142
E36	nd	nd	nd	161,5	663,5	1372,2	1548,7	1561,7	1605,1
E38	nd	nd	nd	nd	637	849,2	1044,3	1128,4	1216,3
E40	nd	nd	nd	nd	nd	1063	1444,5	1543,7	1571,4
E46	nd	nd	nd	nd	nd	912,1	1234	1377,5	1415
E53	nd	nd	nd	nd	107,1	796,8	1296,5	1350,5	1395,7

tableau 5

Production de 4-éthylphénol (EP) par *B. bruxellensis* B17 au cours du temps (jours) dans les 54 essais. (nd : non détectée).

respond au plan d'expérience Box-Behnken. La méthode d'analyse statistique utilisée est celle des moindres carrés. Cette méthode permet de comparer des données expérimentales, souvent entachées d'erreurs, à un modèle mathématique établi pour expliquer ces données. Autrement dit, celle-ci consiste à chercher une relation entre la réponse  $y$  (population ou production d'EP), variable dépendante, et les facteurs  $x$  (pH,  $T^\circ$ , TAV, sucres,  $SO_2$  et lies), variables explicatives, en tenant compte des erreurs observées dans le modèle mathématique (prévision donnée). Cette méthode statistique fournit ainsi plusieurs informations sur le modèle établi :

- **Le résumé des effets** : il fournit la liste des valeurs- $p$  de chaque facteur et interactions entre facteurs. Les valeurs  $p$  définissent les facteurs ayant un effet significatif (positif ou négatif) ou non significatif sur la croissance ou la production de phénols. Ici, le seuil de significativité est de 1 % (seuls les facteurs ayant  $p < 0,01$  ont un effet significatif).

- **Le graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues par le modèle**. Ce graphique permet de voir si le modèle de prédiction est cohérent avec les valeurs obtenues expérimentalement. Si le modèle est parfait, on obtient une droite avec un  $R^2$  égal à 1.

- **L'estimation des coefficients triés**. Elle établit la liste et la nature des effets du modèle

attribués à chaque facteur grâce aux  $t$ -ratios associés calculés par un test de Student. À l'inverse de la  $p$ -value, plus le  $t$ -ratio est élevé, plus la significativité du facteur est grande. D'une part, ce test trie les facteurs par ordre décroissant de leur importance, du plus significatif au moins significatif. D'autre part, il évalue la nature de l'effet exercée par chaque facteur (effets linéaires et quadratiques) ainsi que leurs interactions :

- les valeurs négatives de  $t$ -ratio correspondent à un effet négatif du facteur. C'est-à-dire que plus la concentration du facteur est importante, moins de population et de phénols sont obtenus.
- les valeurs positives des  $t$ -ratio correspondent à un effet positif du facteur. C'est-à-dire que plus la concentration du facteur est importante, plus de population et de phénols sont obtenus. Le seuil de significativité est de 5 %.

- **Le profileur de prévision**. Cette partie est l'une des plus intéressantes pour les vignerons. En effet, chacun des 6 paramètres peut être réglé entre les niveaux haut et bas, ce qui permet de prévoir en temps réel une réponse possible selon les conditions du milieu. Le réglage des facteurs se fait selon une courbe de désirabilité, la désirabilité étant comprise entre 0 et 1. La désirabilité recherchée est la plus proche de 1, sachant que le modèle prend en compte le fait que l'on souhaite minimiser la population de



Source	Croissance				EP			
	Degré de liberté	Somme des carrés	F-value	P-value, Prob>F	Degré de liberté2	Somme des carrés2	F-value 2	P-value, Prob>F2
Modèle	27	257,70796	4,177	<b>0,0002*</b>	27	16653965	7,617	<b>&lt;0,0001*</b>
pH (3,5,4)	1	3,736704	1,6353	0,2123	1	429631,8	5,3055	<b>0,0295*</b>
T (°C) (10,24)	1	52,008704	22,7605	<b>&lt;0,0001*</b>	1	2982573	36,8318	<b>&lt;0,0001*</b>
SO <sub>2</sub> actif (mg/L) (0,0,6)	1	57,877204	25,3287	<b>&lt;0,0001*</b>	1	2210633,3	27,2991	<b>&lt;0,0001*</b>
TAV (% v/v) (12,16)	1	32,690004	14,3061	<b>0,0008*</b>	1	2376173,9	29,3434	<b>&lt;0,0001*</b>
Sucres (g/L) (0,5,6)	1	0,531038	0,2324	0,6338	1	24620,8	0,304	0,5861
Lies (g/L) (0,10)	1	29,018004	12,6991	<b>0,0014*</b>	1	2235345,8	27,6043	<b>&lt;0,0001*</b>
pH*T (°C)	1	1,386112	0,6066	0,4431	1	2257,9	0,0279	0,8687
pH*SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	1	0,056113	0,0246	0,8767	1	776,2	0,0096	0,9228
T (°C)*SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	1	14,987813	6,5591	<b>0,0166*</b>	1	943319,8	11,6491	<b>0,0021*</b>
pH*TAV (% v/v)	1	13,579225	5,9427	<b>0,0219*</b>	1	613206,5	7,5725	<b>0,0107*</b>
T (°C)*TAV (% v/v)	1	8,590513	3,7594	0,0634	1	1070038,2	13,2139	<b>0,0012*</b>
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*TAV (% v/v)	1	14,715313	6,4398	<b>0,0175*</b>	1	331298	4,0912	0,0535
pH*Sucres (g/L)	1	0,006612	0,0029	0,9575	1	306,3	0,0038	0,9514
T (°C)*Sucres (g/L)	1	0,697225	0,3051	0,5854	1	41840,7	0,5167	0,4787
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*Sucres (g/L)	1	0,418613	0,1832	0,6722	1	26807,7	0,331	0,57
TAV (% v/v)*Sucres (g/L)	1	0,006612	0,0029	0,9575	1	306,3	0,0038	0,9514
pH*Lies (g/L)	1	0,000613	0,0003	0,9871	1	776,2	0,0096	0,9228
T (°C)*Lies (g/L)	1	16,502513	7,222	<b>0,0124*</b>	1	971408,9	11,9959	<b>0,0019*</b>
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*Lies (g/L)	1	6,630625	2,9017	0,1004	1	1286409,6	15,8859	<b>0,0005*</b>
TAV (% v/v)*Lies (g/L)	1	1,209012	0,5291	0,4735	1	331298	4,0912	0,0535
Sucres (g/L)*Lies (g/L)	1	0,285013	0,1247	0,7268	1	15762	0,1946	0,6627
pH*pH	1	0,799216	0,3498	0,5594	1	408268,9	5,0417	<b>0,0335*</b>
T (°C)*T (°C)	1	0,222516	0,0974	0,7575	1	166850,3	2,0604	0,1631
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	1	0,166116	0,0727	0,7896	1	65249,3	0,8058	0,3776
TAV (% v/v)*TAV (% v/v)	1	0,002716	0,0012	0,9728	1	15749,5	0,1945	0,6629
Sucres (g/L)*Sucres (g/L)	1	0,057216	0,025	0,8755	1	191299,1	2,3624	0,1364
Lies (g/L)*Lies (g/L)	1	0,389445	0,1704	0,6831	1	73829,4	0,9117	0,3485
Résidus	26	13,098133			26	2105432		
Défaut d'ajustement	21	46,3133042	0,8419	0,6514	21	2105431,9		
Erreur pure	5	13,098133			5	0		

**P<0,05 ; \*effet significatif**

tableau 6

*Brettanomyces* et la concentration en phénols volatils du milieu.

- **Le profileur de surface.** Il permet de représenter les données avec des graphiques en 3 dimensions : deux facteurs sur les axes x et y et la réponse sur l'axe z (les 4 autres facteurs sont fixés aux valeurs centrales). On peut ainsi repérer facilement les interactions entre facteurs. S'il y a interactions, la courbe n'aura pas le même profil pour le facteur 1 selon le niveau du facteur 2 et vice versa.

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus pour les 54 essais établis par le plan d'expérience Box-Behnken (tableau 3) sont présentés en tableaux 4 et 5. Des surfaces tridimensionnelles, décrites par des équations polynomiales de second ordre avec comme variables les facteurs ayant des effets significatifs ou suffisamment importants pour ne pas être écartés, sont construites grâce aux résultats obtenus

**ANOVA des facteurs pH, Température, SO<sub>2</sub> actif, TAV, sucres, glucose et lies ainsi que leurs interactions concernant la croissance et la production d'EP de BR-17 après 56 jours d'incubation.**

# Peut-on contrôler le développement de *Brettanomyces* dans le vin ?

Facteur	t-ratio (effet)	P (prob.>t)
SO <sub>2</sub> actif (mg/L) (0 - 0,6)	-5,03	< 0,0001 *
T (°C) (10 - 24)	4,77	< 0,0001 *
TAV (% v/v) (12 - 16)	-3,78	0,0008 *
Lies (g/L) (0 - 10)	3,56	0,0014 *
T (°C)*Lies (g/L)	2,69	0,0124 *
T (°C)*SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	-2,56	0,0166 *
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*TAV (% v/v)	2,54	0,0175 *
pH*TAV (% v/v)	2,44	0,0219 *
T (°C)*TAV (% v/v)	-1,94	0,0634
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*Lies (g/L)	-1,7	0,1004
pH (3,5 - 4)	-1,28	0,2123
pH*T (°C)	0,78	0,4431
TAV (% v/v)*Lies (g/L)	0,73	0,4735
pH*pH	0,59	0,5594
T (°C)*Sucres (g/L)	0,55	0,5854
Sucres (g/L) (0,5 - 6)	0,48	0,6338
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*Sucres (g/L)	-0,43	0,6722
Lies (g/L)*Lies (g/L)	0,41	0,6831
Sucres (g/L)*Lies (g/L)	0,35	0,7268
T (°C)*T (°C)	-0,31	0,7575
SO <sub>2</sub> actif (mg/L)*SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	0,27	0,7896
Sucres (g/L)*Sucres (g/L)	-0,16	0,8755
pH*SO <sub>2</sub> actif (mg/L)	-0,16	0,8767
pH*Sucres (g/L)	-0,05	0,9575
TAV (% v/v)*Sucres (g/L)	-0,05	0,9575
TAV (% v/v)*TAV (% v/v)	0,03	0,9728
pH*Lies (g/L)	-0,02	0,9871

P<0,05 ; \*effet significatif

tableau 7

Effets linéaire, quadratique et interaction des différents facteurs sur la croissance de *B. bruxellensis* BR-17 après 56 jours d'incubation.

(croissance et la production d'EP) après 56 jours d'incubation. Le R<sup>2</sup> et R<sup>2</sup> ajusté (R<sup>2</sup>aj) indiquent le degré de corrélation de notre modèle avec les résultats expérimentaux. Donc, plus le R<sup>2</sup> et le R<sup>2</sup>aj sont importants (proche de 1), meilleure est la corrélation.

### • Design box-Behnken et analyse statistique

Le modèle mathématique permettant de donner une prévision optimale de l'évolution de la population de levure en fonction des paramètres œnologiques étudiés a été obtenu en faisant interagir les données établies par le PEX Box-Behnken et les résultats expérimentaux après 56 jours d'incubation (56 j). Les résultats obtenus, analysés par la méthode des moindres carrées, sont soumis à une

analyse de variance (ANOVA) pour déterminer les facteurs et/ou interactions entre facteurs ayant un effet significatif ainsi que la significativité du modèle mathématique prévisionnel obtenu. Les résultats de l'analyse de variance, obtenus grâce au logiciel JMP®, sont donnés en tableau 6, et les équations du modèle mathématique décrivant d'une part la croissance de la souche BR-17 et d'autre part sa production d'EP en fonction des 6 paramètres œnologiques étudiés après 56j sont données comme suit :

$$(1) \text{ Population (Log UFC/mL)} = 1,46 - 0,39 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) + 1,47 ((\text{T} - 17) / 7) - 1,55 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) - 1,17 ((\text{TAV} - 14) / 2) + 0,15 ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) + 1,10 ((\text{L} - 5) / 5) + 0,42 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) \times ((\text{T} - 17) / 7) - 1,37 ((\text{T} - 17) / 7) \times ((\text{S} - 0,3) / 0,3) + 0,92 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) * ((\text{TAV} - 14) / 2) - 1,03 ((\text{T} - 17) / 7) * ((\text{TAV} - 14) / 2) + 1,36 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) * ((\text{TAV} - 14) / 2) - 0,03 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) * ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) + 0,21 ((\text{T} - 17) / 7) * ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) - 0,23 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) * ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) - 0,03 ((\text{TAV} - 14) / 2) * ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) - 0,01 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) * ((\text{L} - 5) / 5) + 1,44 ((\text{T} - 17) / 7) * ((\text{L} - 5) / 5) - 0,64 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) * ((\text{L} - 5) / 5) + 0,39 ((\text{TAV} - 14) / 2) * ((\text{L} - 5) / 5) + 0,19 ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) \times ((\text{L} - 5) / 5) + 0,28 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25)^2 - 0,15 ((\text{T} - 17) / 7)^2 + 0,18 ((\text{S} - 0,3) / 0,3)^2 + 0,02 ((\text{TAV} - 14) / 2)^2 - 0,07 ((\text{SR} - 3,25) / 2,75)^2 + 0,19 ((\text{L} - 5) / 5)^2$$

$$(2) \text{ EP (}\mu\text{g/L)} = 1,14 \times 10^{-13} - 133,80 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) + 352,53 ((\text{T} - 17) / 7) - 303,50 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) - 314,65 ((\text{TAV} - 14) / 2) + 32,03 ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) + 305,19 ((\text{L} - 5) / 5) - 16,8 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) \times ((\text{T} - 17) / 7) + 9,85 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) \times ((\text{S} - 0,3) / 0,3) - 343,39 ((\text{T} - 17) / 7) \times ((\text{S} - 0,3) / 0,3) + 195,77 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) \times ((\text{TAV} - 14) / 2) - 365,73 ((\text{T} - 17) / 7) \times ((\text{TAV} - 14) / 2) + 203,5 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) \times ((\text{TAV} - 14) / 2) + 6,19 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) \times ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) + 51,14 ((\text{T} - 17) / 7) \times ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) - 57,89 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) \times ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) + 6,19 ((\text{TAV} - 14) / 2) \times ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) - 9,85 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) * ((\text{L} - 5) / 5) + 348,46 ((\text{T} - 17) / 7) * ((\text{L} - 5) / 5) + -283,55 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) * ((\text{L} - 5) / 5) - 203,5 ((\text{TAV} - 14) / 2) * ((\text{L} - 5) / 5) + 44,39 ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) * ((\text{L} - 5) / 5) + 199,23 ((\text{pH} - 3,75) / 0,25) ^2 + 127,36 ((\text{T} - 17) / 7) ^2 + 79,65 ((\text{S} - 0,3) / 0,3) ^2 + 39,13 ((\text{TAV} - 14) / 2) ^2 + 136,38 ((\text{SR} - 3,25) / 2,75) ^2 + 84,72 ((\text{L} - 5) / 5) ^2$$

où les variables sont : pH, T (température), S (SO<sub>2</sub> actif), TAV, SR (sucres (glucose + fructose)) et L (lies).



L'ANOVA démontre que la température ( $P < 0,0001$ ), le  $\text{SO}_2$  ( $P < 0,0001$ ), le TAV ( $P = 0,0008$ ) et lies ( $P = 0,0014$ ) ont affecté de manière significative la croissance de la souche de *B. bruxellensis* BR-17 (tableau 6). Cependant, le pH (3,5-4) et la concentration en sucres (1-6 g/L) n'ont pas montré d'effets significatifs sur la population ( $P = 0,2123$  et  $P = 0,6338$ , respectivement). Cette analyse statistique indique que les facteurs  $T^\circ$ ,  $\text{SO}_2$ , TAV et lies ont un effet individuel et linéaire sur la croissance de la levure, ce qui n'est pas le cas pour le pH et les sucres à 56 jours d'incubation. Par ailleurs, le pH s'est avéré avoir un effet indirect en interagissant avec le facteur TAV ( $P = 0,0219$ ). Le tableau 6 rapporte qu'en plus de l'effet individuel significatif qu'exerce chacun des quatre premiers facteurs (effet linéaire), leurs interactions avec tous les facteurs peuvent avoir des impacts significatifs sur la population. En effet, l'interaction entre  $\text{pH}^*\text{TAV}$  susmentionné,  $T^\circ*\text{SO}_2$  ( $P = 0,0166$ ),  $\text{SO}_2*\text{TAV}$  ( $P = 0,075$ ) et  $T^\circ*\text{lies}$  ( $P = 0,0124$ ) sont significativement influents.

Concernant la production d'EP, de la même manière que pour la croissance, les facteurs pH,  $T^\circ$ ,  $\text{SO}_2$ , TAV et lies ont montré individuellement un effet significatif et linéaire sur la production d'EP. L'interaction entre certains facteurs a également donné des P-values inférieures au seuil de significativité, c'est le cas de  $T^*\text{SO}_2$ ,  $\text{pH}^*\text{TAV}$ ,  $T^\circ*\text{TAV}$ ,  $T^\circ*\text{lies}$ ,  $\text{SO}_2*\text{lies}$  et  $\text{pH}^*\text{pH}$  (effet quadratique) (tableau 6).

L'ANOVA montre que les équations de régression quadratique 1 et 2 forment des modèles mathématiques donnant des résultats très significatifs ( $P = 0,0002$ ,  $P < 0,0001$ , respectivement) (première ligne du tableau 6). Les F-value de 4,18 et de 7,617 correspondant aux modèles de croissance et production d'EP, respectivement, impliquent leurs significativités. La qualité de l'ajustement des modèles a été vérifiée par la détermination du coefficient de régression ( $R^2$ ) (figure 2). Dans ce cas, le  $R^2$  correspondant à la droite de corrélation entre les résultats observés et ceux prévus par les modèles sont de 0,88 pour la population et de 0,89 pour les EP. Ces  $R^2$  sont satisfaisants et montrent de bonnes corrélations entre les populations et les EP de BR-17 obtenus expérimentalement et ceux prévus par

Facteur	t-ratio (effet)	P (prob.>t)
T (°C) (10-24)	6,07	<0,0001*
TAV (% v/v) (12-16)	-5,42	<0,0001*
Lies (g/L) (0-10)	5,25	<0,0001*
$\text{SO}_2$ actif (mg/L) (0-0,6)	-5,22	<0,0001*
$\text{SO}_2$ actif (mg/L)*Lies (g/L)	-3,99	0,0005*
T (°C)*TAV (% v/v)	-3,64	0,0012*
T (°C)*Lies (g/L)	3,46	0,0019*
T (°C)* $\text{SO}_2$ actif (mg/L)	-3,41	0,0021*
$\text{pH}^*\text{TAV}$ (% v/v)	2,75	0,0107*
pH (3,5-4)	-2,3	0,0295*
$\text{pH}^*\text{pH}$	2,25	0,0335*
$\text{SO}_2$ actif (mg/L)*TAV (% v/v)	2,02	0,0535
TAV (% v/v)*Lies (g/L)	-2,02	0,0535
Sucres (g/L)*Sucres (g/L)	1,54	0,1364
T (°C)*T (°C)	1,44	0,1631
Lies (g/L)*Lies (g/L)	0,95	0,3485
$\text{SO}_2$ actif (mg/L)* $\text{SO}_2$ actif (mg/L)	0,9	0,3776
T (°C)*Sucres (g/L)	0,72	0,4787
$\text{SO}_2$ actif (mg/L)*Sucres (g/L)	-0,58	0,57
Sucres (g/L) (0-5,6)	0,55	0,5861
Sucres (g/L)*Lies (g/L)	0,44	0,6627
TAV (% v/v)*TAV (% v/v)	0,44	0,6629
$\text{pH}^*\text{T}$ (°C)	-0,17	0,8687
$\text{pH}^*\text{Lies}$ (g/L)	-0,1	0,9228
$\text{pH}^*\text{SO}_2$ actif (mg/L)	0,1	0,9228
$\text{pH}^*\text{Sucres}$ (g/L)	0,06	0,9514
TAV (% v/v)*Sucres (g/L)	0,06	0,9514
<b>P&lt;0,05 ; *effet significatif</b>		

tableau 8

Effets linéaire, quadratique et interaction des différents facteurs sur la production d'EP par *B. bruxellensis* BR-17 après 56 jours d'incubation.

les modèles en tenant compte du nombre de facteurs étudiés sur du matériel vivant.

Les P-values des défauts d'ajustement de ces deux modèles ne sont pas significatives par rapport aux erreurs pures (tableau 6), ce qui est idéal pour ajuster le modèle. Ainsi, ces modèles peuvent être utilisés pour la construction des courbes de surface de réponse 3D ainsi que pour la navigation (profiler de surface) sur l'étendue des surfaces ainsi conçues.

#### • Courbes de surface de réponse 3D (SR-3D)

Les résultats obtenus ici correspondent à l'influence des différents facteurs significatifs sur la population de la levure et la production de phénols après 56 jours d'incubation.

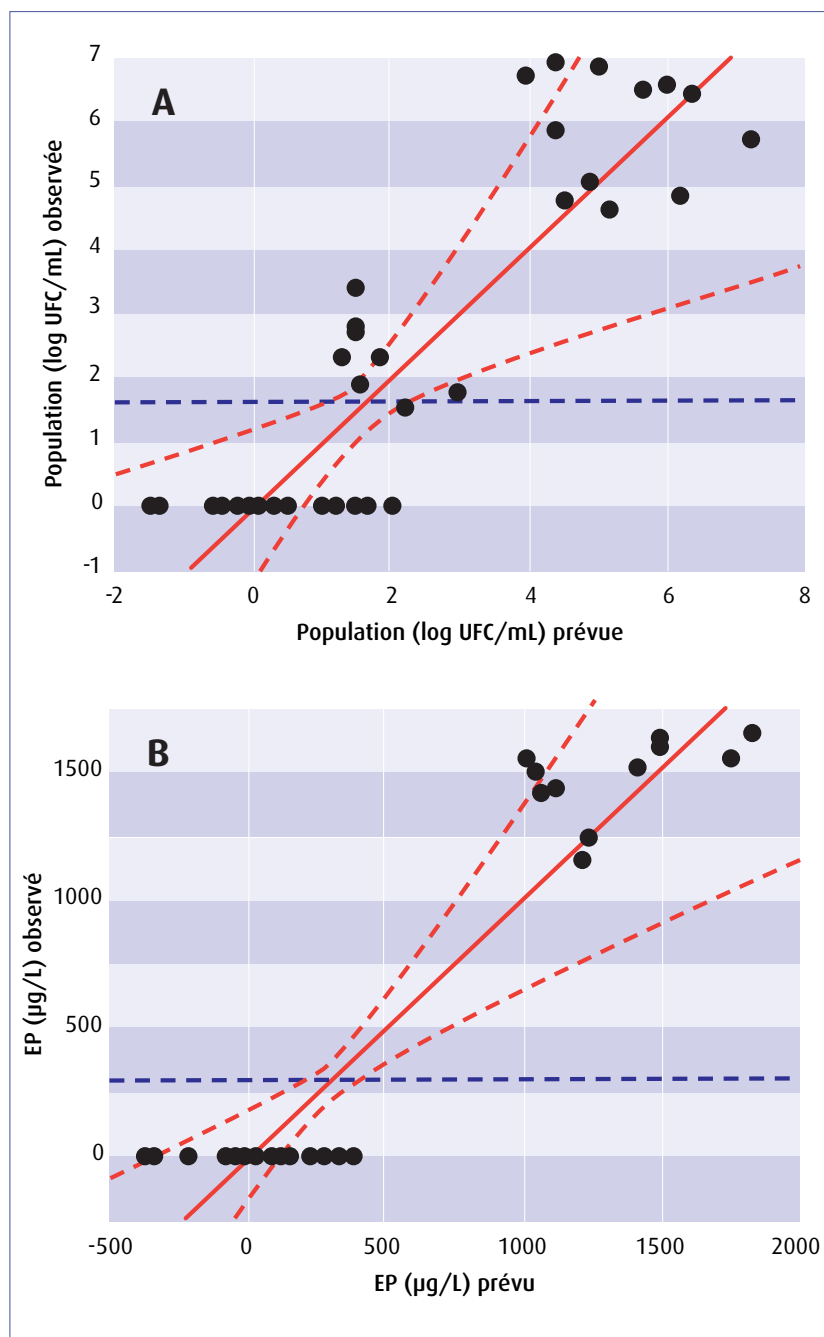


figure 3

**Droites de corrélation entre les résultats observés et les résultats prévus par les modèles population ( $R^2=0,88$ ,  $R^2_{aj}=0,62$ ) (A) et EP ( $R^2=0,89$ ,  $R^2_{aj}=0,77$ ) (B).**

Les SR-3D ainsi obtenus sont représentées en fonction de deux facteurs (variables, axes x et y) en maintenant les 4 autres facteurs constants avec les valeurs centrales (ex : pour étudier l'effet du  $SO_2$  et pH on fixe les autres facteurs :  $T^\circ$  ( $17^\circ C$ ), TAV (14 % v/v), sucres (3,5 g/L), lies (5 g/L). Les réponses (population ou production d'EP) sont représentées sur l'axe z.

Chaque facteur ayant présenté un impact significatif sur la population et/ou l'EP sera étudié en relation avec tous les autres facteurs.

### → Effets des différents facteurs étudiés sur la croissance de *B. bruxellensis* BR-17

Les facteurs ayant présenté un effet significatif sur la croissance de la souche BR-17 après 56j d'incubation sont : le  $SO_2$ , le TAV, la température et les lies.

Le  $SO_2$  et le TAV ont montré des effets très significatifs et linéaires sur la mort ou la non-cultivabilité cellulaire, confirmés mathématiquement par des effets négatifs (valeurs de l'effet (t-ratio) négatives) et linéaires sur la croissance de la souche de levure *B. bruxellensis* BR-17 après 56 j d'incubation (tableau 7).

Les graphiques de surface de réponse de la croissance de levure en fonction du  $SO_2$  et TAV, et l'interaction  $SO_2 * TAV$  (figures 3 et 4) illustrent la contribution négative et linéaire de ces facteurs au modèle de croissance de la souche BR-17. En effet, une augmentation de la concentration du  $SO_2$  actif et/ou du TAV induit une diminution drastique de la population de la levure dans le vin. Dans le cas de l'interaction  $SO_2 * TAV$ , on remarque que l'effet inhibiteur du TAV est fortement accentué par les fortes concentrations du  $SO_2$  actif. Ainsi, on observe un effet synergique sur la diminution de la croissance de la souche BR-17 (plus le  $SO_2$  et le TAV sont importants (proche de 0,6 mg/L, 16 % v/v), plus l'effet létal est important) (figure 3).

L'effet du  $SO_2$  sur l'inhibition de la croissance des souches de levures *Brettanomyces* est à ce jour très bien documenté, même si les mécanismes d'action de ces molécules sur les cellules restent à approfondir. Du Toit *et al.* (2005) ont rapporté que des concentrations de 0,25 à 0,35 mg/L de  $SO_2$  actif permettent une baisse de viabilité de *B. bruxellensis*. Cependant, il faut tenir compte de l'existence d'un grand nombre de souches de levures *Brettanomyces* présentant des tolérances plus au moins fortes quant à la concentration du  $SO_2$  (Barata *et al.*, 2008). En effet, sur 35 souches de levures *Brettanomyces*, près de la moitié ont montré une résistance à une concentration de 30 mg/L de  $SO_2$  libre (Conterno *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que pour les valeurs cen-

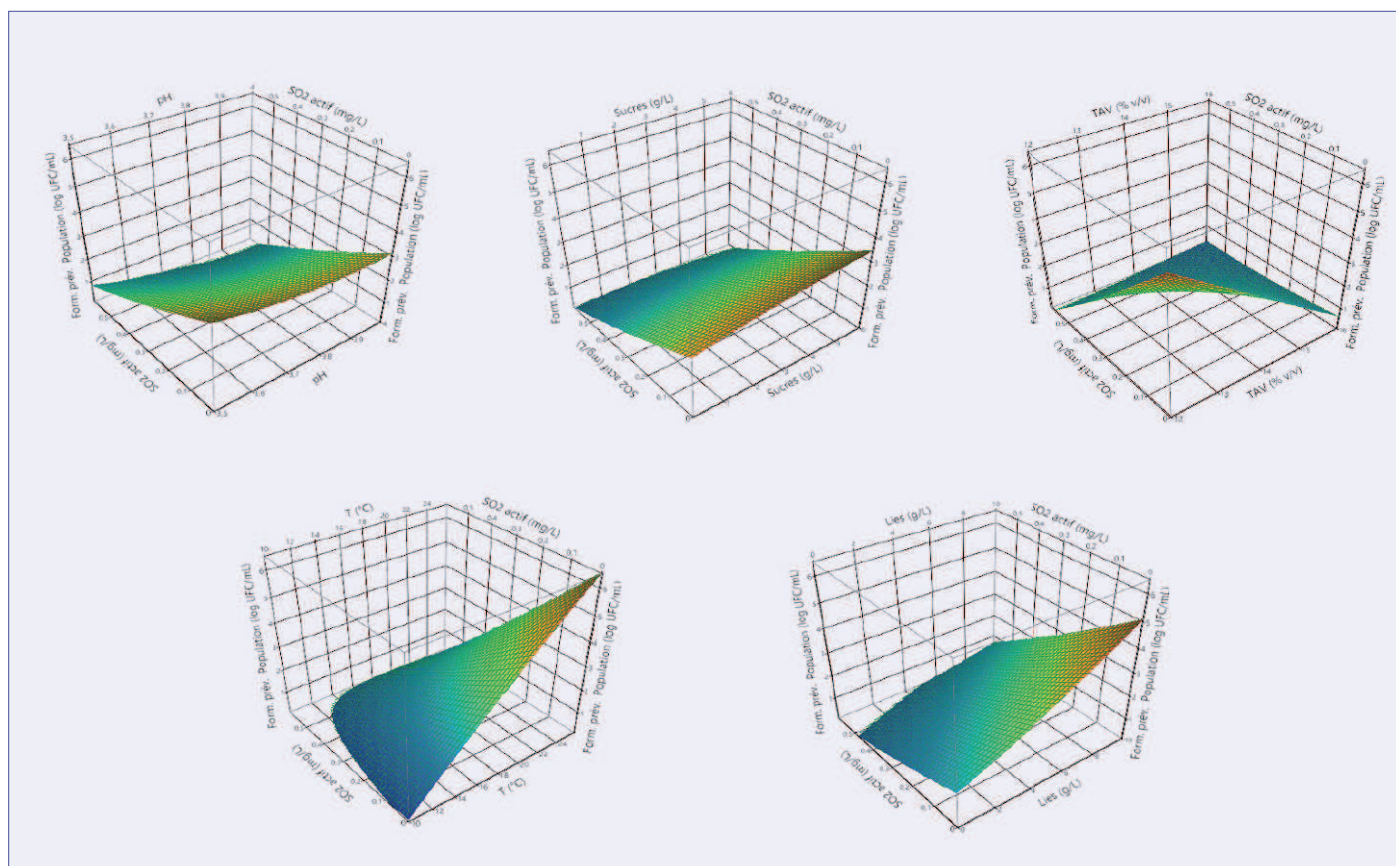


figure 4

trales des facteurs étudiés, une concentration supérieure à 0,3 mg/L de  $\text{SO}_2$  actif s'est montrée drastique pour la levure (tableau 2 et 4). Barata *et al.* (2008) ont démontré qu'une concentration en  $\text{SO}_2$  actif de 0,66-1 mg/L induisait une mortalité de la totalité des souches (17 souches) testées. Ces résultats sont en accord avec les résultats de cette étude : les 12 modalités correspondant à des concentrations de 0,6 mg/L de  $\text{SO}_2$  actif, quelle que soit la variation des autres paramètres, n'ont montré aucune viabilité au bout de 56 jours d'incubation.

L'éthanol est le produit principal de la fermentation alcoolique. Son action est très négative sur le développement des levures et sur la viabilité cellulaire (Strehaiano, 1984). Cependant, certaines souches de levures *Brettanomyces* peuvent présenter une très forte tolérance à l'éthanol. Plus de 30 souches différentes et d'origines diverses ont été testées par Conterno *et al.* en 2006 pour une teneur de 10 % (v/v) d'éthanol dans un milieu synthétique : toutes les souches ont résisté à

cette concentration d'éthanol. Une autre étude a mis en évidence la résistance d'une trentaine de souches à des teneurs supérieures à 13,5 % (v/v) en milieu synthétique et en vin (Barata, *et al.*, 2008). Dans notre cas, les teneurs en TAV proche de 16 % v/v se sont avérées létales pour la souche BR-17 étudiée. Par ailleurs, même s'il a été montré que le taux de croissance et le rendement en biomasse peuvent être fortement diminués par la présence d'éthanol (Medawar, 2003), certaines souches de la levure *Brettanomyces* présentent une tolérance à des teneurs élevées. C'est le cas de la souche *B. bruxellensis* ISA 2211 présentant une résistance à une teneur de 15 % v/v d'éthanol (Chandra *et al.*, 2014).

La température et les lies (figures 5 et 6) ont montré des effets significatifs positifs et linéaires sur le développement de la souche de levure *B. bruxellensis* BR-17. On relève dans cette étude que la souche de levure *B. bruxellensis* BR17 est sensible à la température comme tout autre microorganisme. Les températures basses

**Surfaces de réponse des données expérimentales correspondant à la croissance de *B. bruxellensis* BR-17 après 56 jours d'incubation en fonction du  $\text{SO}_2$  actif, pH, sucres, TAV, température et lies dans du vin synthétique.**

Surfaces de réponse des données expérimentales correspondant à la croissance de *B. bruxellensis* BR-17 après 56 jours d'incubation en fonction du TAV, pH, sucres, température et lies dans du vin synthétique.

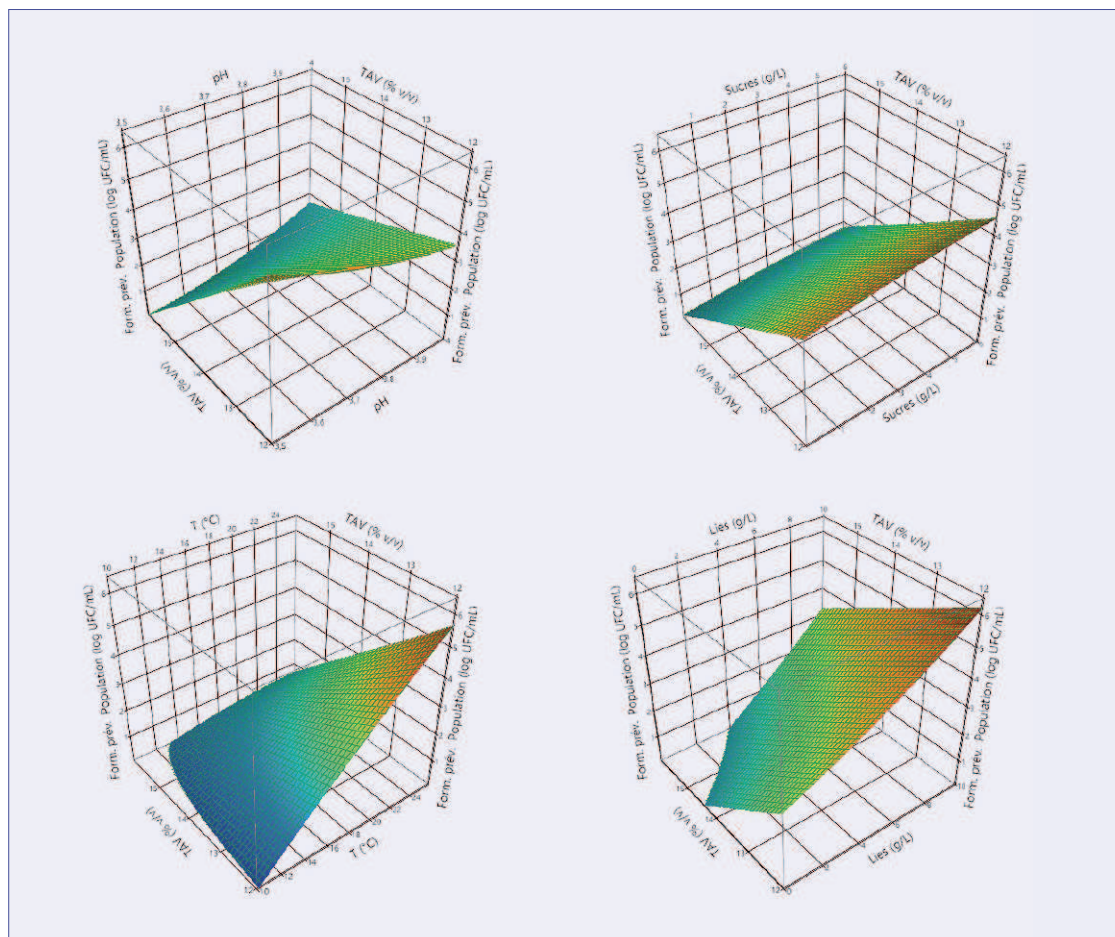


figure 5

(proches de 12 °C) bloquent sa croissance et des températures supérieures à 17°C favorisent son développement. Plusieurs études ont montré l'effet de la température sur l'activité métabolique et ainsi sur la croissance des microorganismes. Aux faibles températures, l'activité cellulaire microbienne peut être totalement bloquée. Par contre, une élévation de la température va augmenter la vitesse de croissance. En effet, on considère généralement qu'à chaque augmentation de 10°C, la vitesse de réaction catalysée par une enzyme sera doublée. Alors, le métabolisme cellulaire sera plus actif aux températures plus élevées et le microorganisme se développera plus vite. Cependant, au-delà d'un certain point, de nouvelles augmentations diminuent la croissance et des températures trop élevées sont létales, puisqu'elles endommagent les microorganismes en dénaturant les enzymes, les systèmes de transport et d'autres protéines (Martinez, 2007).

L'effet positif des lies sur la croissance (figure 5) peut s'expliquer par le fait qu'elles constituent une source importante de nutriments (libérés lors de la lyse des cellules, ex : acides aminés). En effet, des valeurs supérieures à 5 g/L accentuent la croissance de la levure.

L'interaction température\*SO<sub>2</sub> (figure 3), température\*/lies (figure 6) ou encore SO<sub>2</sub> et lies (figure 3) montrent des effets synergiques sur le taux de population après 56 jours d'incubation. En effet, les surfaces de réponses respectives indiquent qu'une basse température et un fort taux de SO<sub>2</sub>, une basse température et une faible concentration de lies ou un SO<sub>2</sub> élevé et une faible concentration de lies accentuent la mortalité de la levure BR-17.

L'interaction entre le TAV et les lies (figure 4) montre un effet synergique sur l'inhibition de la croissance de la levure. On remarque ici, que le TAV a un effet sur la diminution du taux de

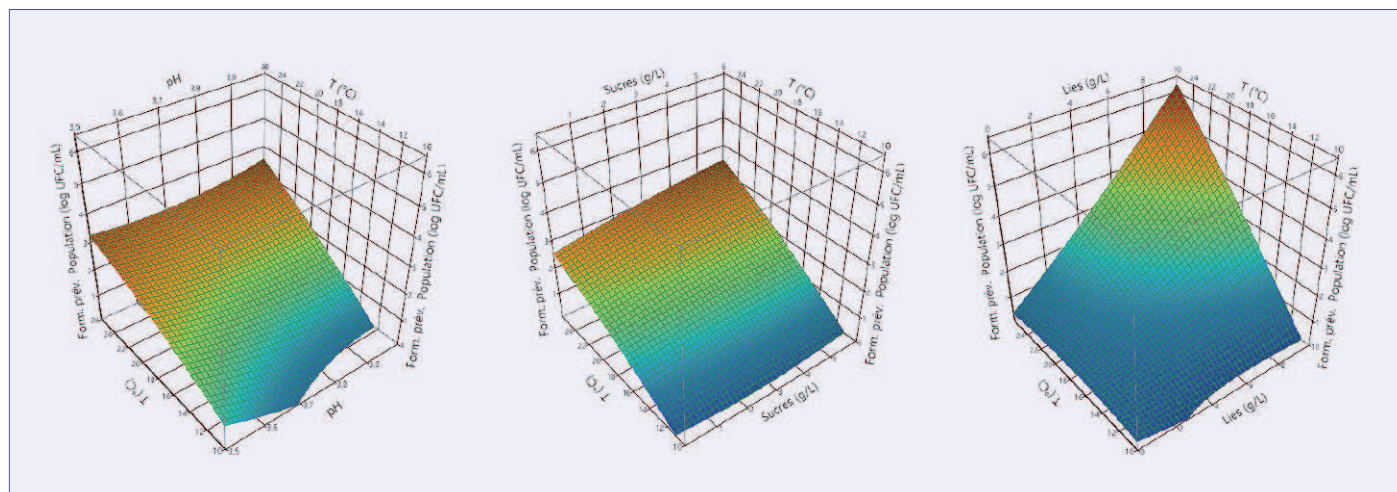


figure 6

population de manière linéaire mais n'induit pas sa mortalité. En effet, même dans le cas extrême de fort TAV on observe des populations d'environ  $10^4$  UFC/mL. Ce résultat peut être expliqué par la haute tolérance de cette souche de *Brettanomyces* aux fortes concentrations en alcool (jusqu'à 15 % v/v), d'une part. D'une autre part, ces résultats suggèrent que la présence de lies (> 5 g/L) diminuerait l'effet inhibiteur de l'éthanol.

Par ailleurs, la question qui se pose est que les sucres constituent une source d'énergie (source de carbone) importante pour la multiplication de la levure. Ils sont donc censés influencer positivement la croissance alors que ce n'est pas le cas ici. Ceci peut s'expliquer par le fait que les résultats modélisés sont ceux correspondant au 56ème jour d'incubation. A cet instant, il ne reste sans doute plus de sucres dans le milieu, tradui-

sant l'effet négligeable de ce paramètre. Donc la viabilité de la levure n'est influencée que par les facteurs  $\text{SO}_2$ , TAV,  $T^\circ$  et lies. Autrement dit, la modélisation des données dans les premiers jours d'incubation aurait montré l'effet significatif des sucres sur la croissance. En effet, dans une étude similaire, le sucre (glucose) a montré un effet positif sur la croissance de la levure *Brettanomyces* après 2 jours d'incubation mais aucun effet n'a été relevé à partir du 30ème jour d'incubation (Chandra *et al.*, 2014).

#### → Effets des différents facteurs étudiés sur la production d'éthylphénols par *B. bruxellensis* BR-17

Les facteurs présentant des effets significatifs sur la production d'EP après 56 jours d'incubation sont pratiquement les mêmes que ceux ayant

**Surfaces de réponses des données expérimentales correspondant à la croissance de *B. bruxellensis* BR-17 après 56 jours d'incubation en fonction de : température, pH, sucres et lies dans du vin synthétique.**

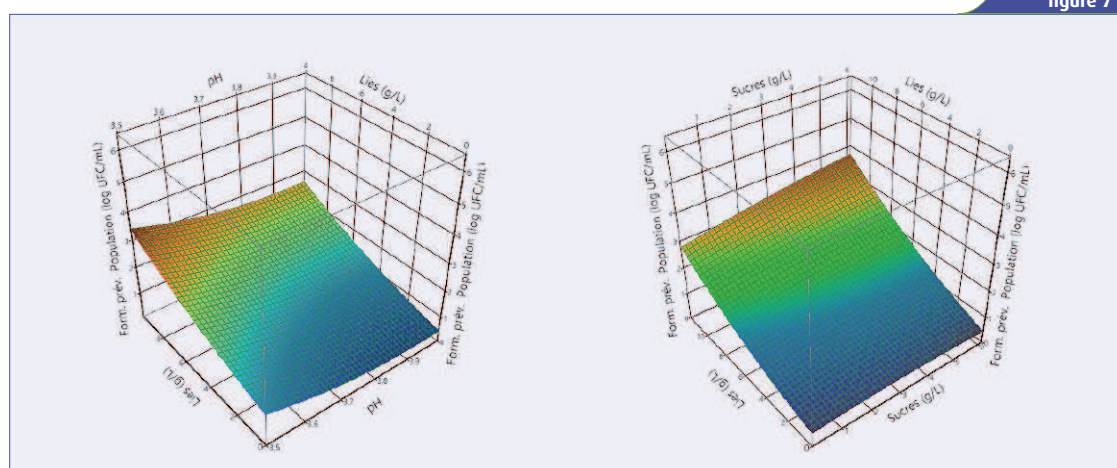


figure 7

**Surfaces de réponses des données expérimentales correspondant à la croissance de *B. bruxellensis* BR-17 après 56 jours d'incubation en fonction des lies, pH et température dans du vin synthétique.**



## Peut-on contrôler le développement de *Brettanomyces* dans le vin ?

40

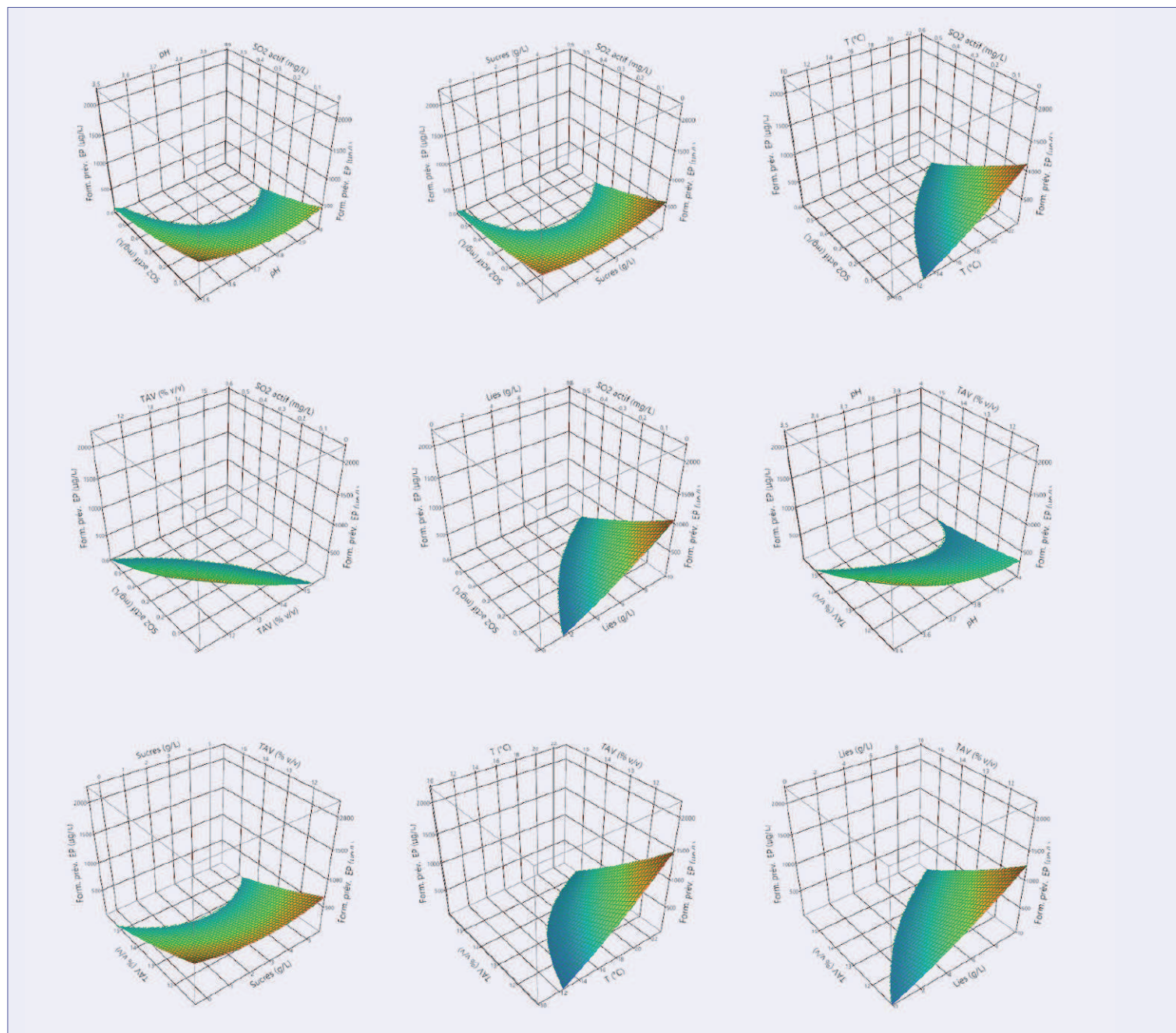


figure 8

montré des effets sur la croissance de la levure étudiée :  $\text{SO}_2$ , TAV, température, lies et en moindre mesure le pH (tableau 8).

L'allure des surfaces de réponses obtenues pour la production d'EP après 56 jours d'incubation reflète l'inhibition prédominante (effets négatifs et linéaires ou quadratiques) des facteurs  $\text{SO}_2$  et TAV qui peut être expliquée par leurs rôles

dans la mortalité cellulaire et par conséquent la diminution drastique ou l'absence de production d'EP (figure 8). A l'inverse, la température et la concentration en lies ont montré des effets positifs sur la production des EP par la levure *B. bruxellensis* BR-17 (figure 8).

En général, des concentrations en  $\text{SO}_2$  actif proches de 0,6 mg/L, TAV proche de 16 % v/v

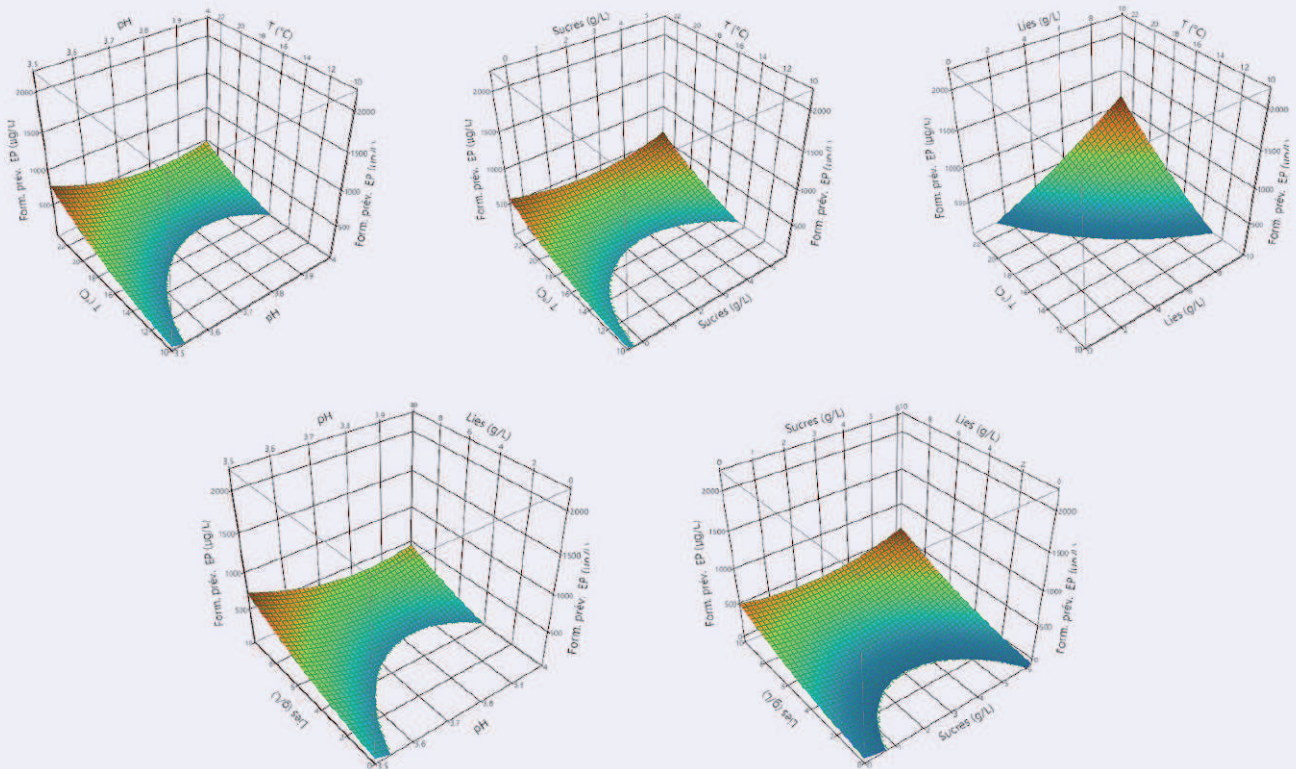


figure 8

(>14 % v/v), température proche de 10°C ou l'absence de lies (0 g/L) se sont montrés individuellement létaux pour la levure (tableaux 3, 4 et 5).

De manière intéressante, les interactions entre facteurs montrent une synergie dans l'inhibition ou la mortalité cellulaire et ainsi la non production d'EP. En effet, pour une concentration supérieure ou égale à 0,3 mg/L de SO<sub>2</sub> actif, une concentration de 14 % v/v suffit pour bloquer la croissance de la levure et la production de phénols (en gardant les autres paramètres aux valeurs centrales) (tableaux 3, 4 et 5). Cependant, en absence de SO<sub>2</sub> actif le TAV de 14 % v/v n'a pas d'effet inhibiteur sur la croissance et la production de phénols.

Dans certaines conditions de fortes concentrations en éthanol (>14%), la levure a montré un maintien de population aux alentours de 10<sup>2</sup> UFC/mL (ex : E54, 16 % v/v) mais aucune production de phénols n'a été observée (tableau 2). L'absence de production de phénols, bien que la levure *Brettanomyces* reste viable, peut s'expliquer par les observations de Benito *et al.* (2009). Ces

auteurs ont rapporté qu'une exposition de la levure *B. bruxellensis* à un TAV de 15 % v/v entraîne un arrêt de l'activité des deux enzymes clés (acide phénol décarboxylase et vinyl phénol réductase) responsables de la conversion des acides cinnamiques en 4-EP.

La figure 8 représentant l'effet de l'interaction entre les facteurs étudiés sur la production d'EP montre des courbes ayant pratiquement les mêmes allures que celles obtenues pour la croissance de la levure. En effet, des effets synergiques sont relevés en fonction de SO<sub>2</sub> et température, SO<sub>2</sub> et lies, TAV et température, TAV et lies, température et lies.

Concernant le facteur lies, à de fortes concentrations, il n'a pas montré un effet sur la diminution des phénols dans le milieu, contrairement à ce qui a été observé dans la littérature (Chassagne *et al.*, 2005). Ces auteurs ont rapporté l'effet des lies sur l'adsorption des EP et ainsi la diminution de leur concentration dans le vin. La contradiction de ces résultats pourrait s'expliquer par le fait que dans notre étude, nous avons utilisé un vin synthétique

**Surfaces de réponses des données expérimentales correspondant à la production d'EP par la levure *B. bruxellensis* BR-17 après 56 jours d'incubation en fonction du SO<sub>2</sub> actif, pH, sucres, TAV, température et lies dans du vin synthétique.**

(solution hydro-alcoolique enrichie). Le constat de Chassagne *et al.* (2005) a été confirmé dans notre laboratoire (Inter-Rhône, 2016 - résultats non exploités dans cet article) en reconduisant notre étude dans du vin rouge (une concentration en lies de 10 g/L permet la diminution de près de la moitié des EP produits).

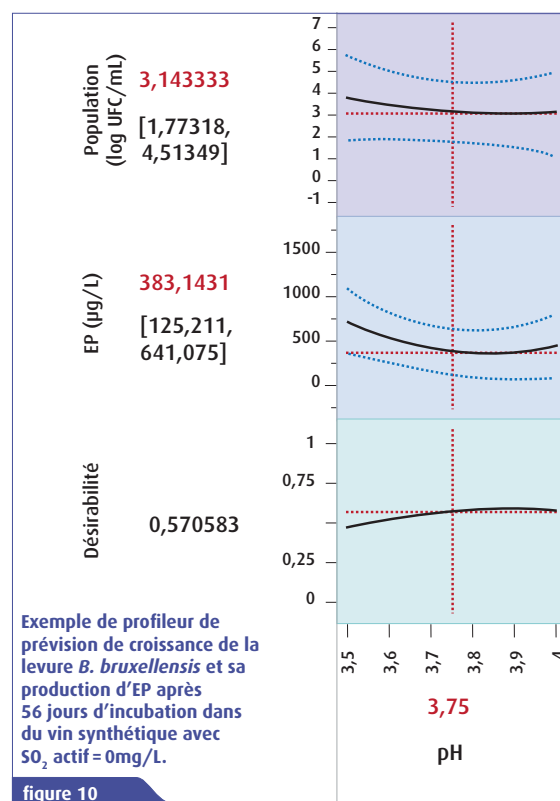
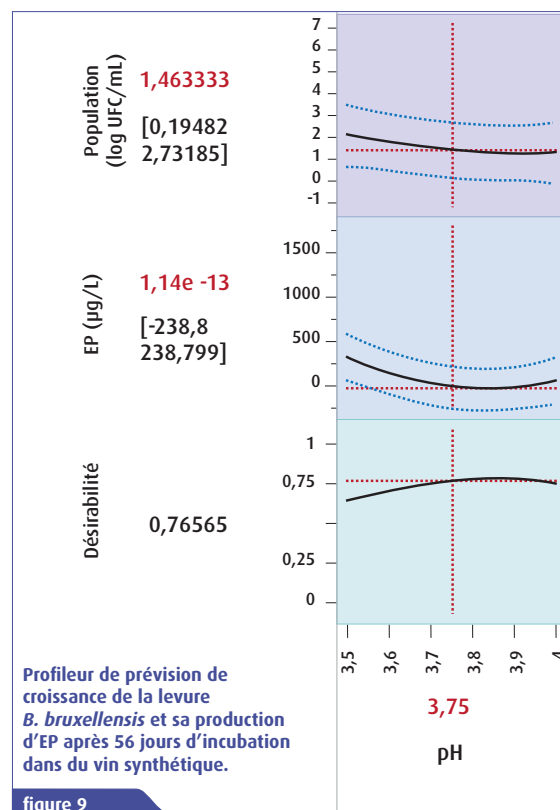
### • Profileur de prévision

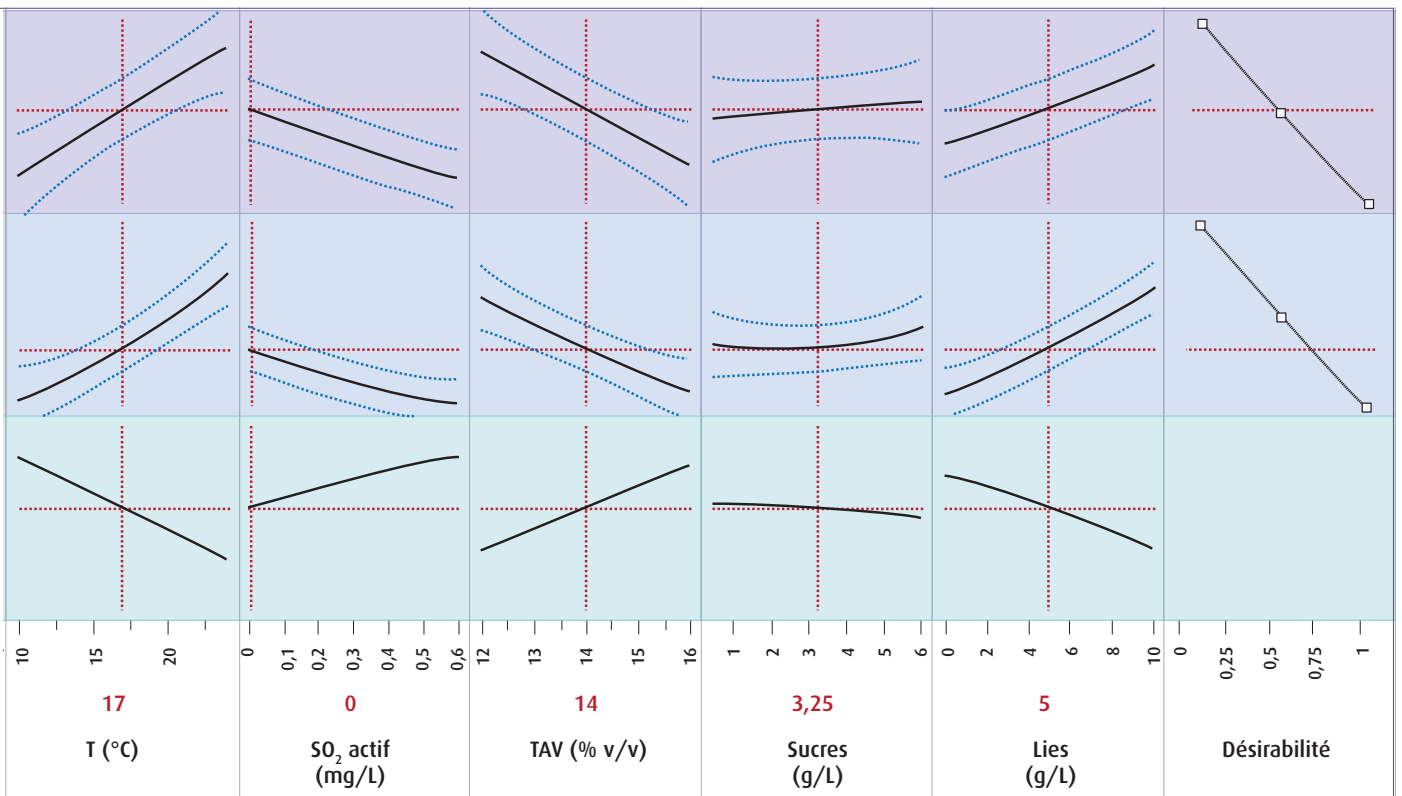
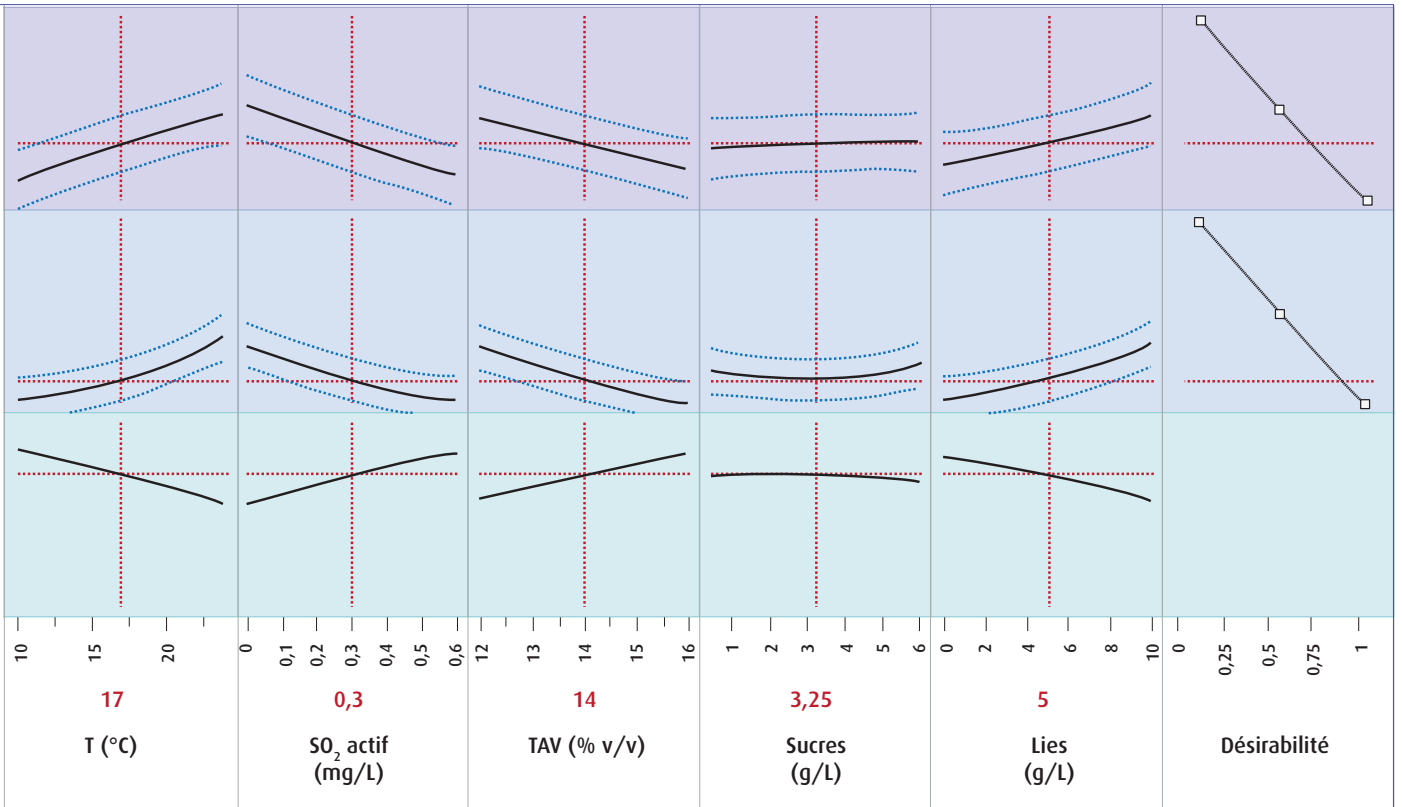
La modélisation des données obtenues dans cette étude a permis la construction d'un modèle de prévision (croissance de *Brettanomyces* et la production de phénols) généré grâce à des équations mathématiques ayant pour variables six paramètres œnologiques (pH, température, SO<sub>2</sub>, TAV, sucres et lies).

La figure 9 présente le profileur de prévision pour la souche de levure *B. bruxellensis* BR-17. Il permet d'observer la réponse (population et EP) prévue par le modèle selon la valeur des différents facteurs ainsi que le degré de désirabilité (comme nous souhaitons avoir le moins possible de population de *Brettanomyces* et de phénols, la désirabilité est optimale lorsqu'elle est proche de 1). Dans cet exemple (figure 9), les paramètres œnologiques étudiés sont fixés aux valeurs centrales. Donc, dans un milieu vin synthétique présentant un pH égal à 3,75, une température à 17°C, une concentration en SO<sub>2</sub> actif égale à 0,3 mg/L, un TAV de 14 % v/v, une concentration en sucres de 3,25 g/L et une concentration en lies de 5 g/L, on obtient après 56 jours d'élevage une population de 1,46 Log UFC/mL (environ 30 UFC/mL) et aucune production d'EP.

Pour donner un autre exemple, si on garde les mêmes valeurs du pH, température, TAV, sucres et les lies que pour l'exemple précédent (figure 9) et qu'on simule l'absence du SO<sub>2</sub> (SO<sub>2</sub> actif = 0 mg/L) (figure 10), alors notre modèle prévoit une population de 3,14 Log UFC/mL (environ 103 UFC/mL) et une production d'EP de 383,14 µg/L après 56 jours d'incubation.

Ces exemples montrent la cohérence de notre modèle avec l'effet du SO<sub>2</sub> sur les populations et la production de phénols. En outre il montre qu'un apport de 0,3 mg/L de SO<sub>2</sub> actif, dans ces conditions, suffit pour prévenir le risque de déviation phénolé.





## Peut-on contrôler le développement de *Brettanomyces* dans le vin ?

44



### CONCLUSION

L'approche par méthodologie de surface de réponse avait pour objectif d'expliquer le comportement de la croissance de la levure *B. bruxellensis* ainsi que sa production d'éthyl phénols vis-à-vis du  $\text{SO}_2$ , TAV, température, lies, pH et sucres. Après 56 jours d'incubation, différentes réponses ont été observées concernant la croissance et la production d'EP. Dans tous les cas, la production de phénols est conditionnée par la croissance de la levure. Les réponses linéaires les plus significatives ont été induites par le  $\text{SO}_2$ , le TAV, la température et les lies. Dans le vin synthétique, le  $\text{SO}_2$  et le TAV ont montré des effets inhibiteurs prononcés sur la croissance de *Brettanomyces*, alors que la température élevée (17-22°C) et la présence de lies favorisent leur multiplication. Les interactions entre les facteurs étudiés ont révélé des effets synergiques sur le développement des levures et par conséquent sur la production des EP. Donc l'action inhibitrice des deux facteurs s'amplifie. C'est-à-dire que l'effet de deux facteurs à des concentrations moyennes (ex :  $\text{SO}_2$  actif à 0,3 mg/L et TAV 14 % v/v) est aussi impactant que des concentrations extrêmes de chacun des facteurs (0,6 mg/L ou 16 % v/v, respectivement). Nos résultats



ne montrent aucun effet linéaire ni aucune interaction entre les sucres (glucose et fructose) et les autres facteurs sur la croissance et la production de phénols après 56 jours d'incubation. Ceci sous-entend que les faibles concentrations en sucres résiduels volontairement laissés dans certains vins rouges pour apporter plus de rondeur en bouche, ne présentent pas systématiquement un risque d'altération par *Brettanomyces*. Cette étude est actuellement reconduite dans notre laboratoire mais dans du vin rouge pour évaluer

et valider notre modèle de prévision en conditions réelles d'élevage.

Le modèle mathématique ainsi obtenu nous permettra de mettre en œuvre un outil de prévision (sous forme d'application numérique) permettant d'évaluer la vulnérabilité d'une matrice de vin rouge au risque *Brettanomyces* ainsi que de proposer des éléments de prévention contre le caractère phénolé dans les vins de la Vallée du Rhône.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier FranceAgrimer pour leur soutien financier du programme National GNBrett.

## BIBLIOGRAPHIE

- Barata A., Gonzáles S., Malfeito-Ferreira M., Querol, A. et Loureiro V. 2008. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research*, 8 (7) 1008-1017.
- Barbin Pascal. 2006. Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge.
- Chandra M., A. Barata S. Ferreira-Dias M. Malfeito-Ferreira et V. Loureiro. 2014. « A Response Surface Methodology study on the role of factors affecting growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 in wine ». *Food Microbiology* 42 (septembre) : 40-46.
- Chassagne D., Guilloux-Benatier M., Alexandre H. et Voilley A. 2005. « Sorption of wine volatile phenols by yeast lees ». *Food Chemistry* 91 (1) : 39-44.
- Chatonnet P., Dubourdieu D. et Boidron J.N. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46 : 463-468.
- Connel L., Stender H., Edwards C.G. 2002. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 322-324.
- Conterno L., Aprea E., Franceschi P., Viola R., et Vrhovsek U. 2013. « Overview of *Dekkera bruxellensis* behaviour in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolomic approaches ». *Food Research International* 51 (2) : 670-78.
- Conterno L., Joseph C.M.L., Arvik T.J., Henick-Kling T. et Bisson L.F. 2006. Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 : 139-147.
- Dias L., Pereira-da-Silva S., Tavares M., Malfeito-Ferreira M. et Loureiro V. 2003. « Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions ». *Food Microbiology* 20 (4) : 377-84.
- Du Toit W.J., Pretorius I.S. et Lonvaud-Funel A. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* 98 : 862-871.
- Martinez C. 2007. *Brettanomyces bruxellensis* : Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation. Influence des facteurs environnementaux. Thèse de Doctorat soutenue à l'école Polytechnique de Toulouse.
- Medawar W. 2003. Etude physiologique et cinétique des levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte œnologique. Thèse INP Toulouse, France
- Monje M.C., Privat C., Gastine V. et Nepveu F. 2002. Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), pp111-117.
- Renouf V. 2006. Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres - Relation avec la qualité du vin. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Serpaggi V. 2011. Étude et caractérisation de l'état « Viable mais Non Cultivable » chez *Brettanomyces*, une levure d'altération des vins : nouvel outil de détection et de quantification spécifique de *Brettanomyces* en vin. Thèse de Doctorat soutenue à l'Université de Bourgogne.
- Stefanini I., Dapporto L., Legras J.-L., Calabretta A., Paola M. D., Filippo C.D., Viola R., Capretti P., Polsini M., Turillazzi S. et Cavalieri D. 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13398-13403.
- Strehaieno P. 1984. Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Sturm M.E., Arroyo-López F.N., Garrido-Fernández A., Querol A., Mercado L.A., Ramirez M.L. et Combina M. 2014. « Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO<sub>2</sub> using time as a dummy variable ». *International Journal of Food Microbiology* 170 (janvier) : 83 90.
- Van der Walt J.P. et Van Kerckhove A.E. 1959. The wine yeasts of the Cape - II - The occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii* in South African table wines. *Antonie van Leeuwenhoek*, 25, pp145-151
- Wijsman M.R., Van Dijken J.P., Van Kleeff B. H.A. and Scheffers W.A. 1984. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek* 50 :183-192.