

## ***Azote et microorganismes, états des lieux et questionnements possibles sur de meilleurs équilibres à trouver***

RENOUF Vincent, [vrenouf@labexcell.com](mailto:vrenouf@labexcell.com)

L'azote est un élément clef de nos environnements. La vigne et le vin ne font pas exception, les microorganismes qui s'y développent non plus. C'est donc très logiquement que le sujet de l'azote dans sa globalité a été l'objet d'innombrables travaux en viticulture et en œnologie. Les phénomènes sont également intimement liés aux évolutions du climat, aux pratiques culturales et aux objectifs de productions, aspects au centre de nombreuses préoccupations actuelles.

Concernant les microorganismes, l'azote est un élément fondamental de leurs constitutions (protéines, matériels génétiques, composés pariétaux...) et de leurs contributions lors des fermentations aux qualités des vins ; de nombreux métabolismes de révélations ou de productions d'arômes sont fortement liés aux métabolismes azotés dans leur ensemble. Cependant, outre les déterminations d'azote total (méthode de Kjeldahl, relativement peu exploitée en œnologie par rapport à d'autres boissons où elle fait référence comme le cidre et la bière) et celle de l'azote dit assimilable pour les levures de la fermentation, peu d'éléments précis existent dans la littérature pour caractériser finement la composition azotée d'un raisin, d'un moût ou d'un vin. Il est en effet relativement rare de voir des énumérations précises des acides aminés qui composent ces produits.

Au laboratoire EXCELL, afin de compléter les éléments analytiques disponibles, nous avons développé une méthode de dosage des protéines totales, une méthode de caractérisation des différents types de protéines (par électrophorèse) ainsi qu'une méthode de dosage des acides aminés libres. Les deux premières approches analytiques s'avèrent utiles dans la compréhension des phénomènes de stabilisation protéique sur vins blancs et rosés (thématique qui sera spécifiquement traitée dans un prochain article). La troisième approche a été envisagée par plusieurs de nos partenaires pour piloter précisément les fermentations mais également aider la stabilisation microbiologique une fois les fermentations achevées. En bénéficiant de ces caractérisations exhaustives, l'objectif est d'affiner les apports d'azote (stade, quantité, type d'apport...) mais également envisager les résidus d'apports azotés en fin de fermentations comme des indicateurs d'un risque d'instabilité microbiologique. Ces questionnements sont parfaitement légitimes, et rappelons qu'ils ne sont pas résolument inédits, puisqu'il y a plusieurs dizaines d'années les premiers cas de détections d'amines biogènes dans les vins avaient été investigués dans le cadre d'excès d'apports de fumures azotées au vignoble. La première partie de cet écrit évoque les analyses d'acides aminés réalisées sur raisins et sur moûts, en les illustrant des suivis où des déséquilibres suspectés ont concourus à des problématiques diverses. La seconde partie évoque les questionnements entre les résidus d'azote organique en fin de fermentation et la sensibilité au développement des *Brettanomyces*.

## 1- **Bilan de campagnes de dosage d'acides aminés sur raisins et sur moûts ; liens possibles avec certains phénomènes atypiques.**

Dans la première édition du livre « Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications », les auteurs (Lonvaud-Funel et al. 2021) classifient les acides aminés selon leur vitesse d'assimilation par *Saccharomyces cerevisiae*. Le tableau 1 reprend ces éléments. Dans ce même chapitre, les auteurs illustrent ces propos de dosages d'acides aminés dans des moûts de différents cépages évoquant ainsi une très forte disparité : les concentrations totales variant du simple ou double selon les moûts.

<b>Groupe A</b> <b>Utilisation totale et rapide</b>	<b>Arginine, aspartate, asparagine, glutamine, isoleucine, leucine, lysine, sérine, thréonine</b>
<b>Groupe B</b> <b>Utilisation totale et lente</b>	<b>Glutamate, alanine, histidine, valine, méthionine, phénylalanine</b>
<b>Groupe C</b> <b>Utilisation partielle après utilisation du groupe A</b>	<b>Glycine, tyrosine, tryptophane</b>
<b>Groupe D</b> <b>Utilisation partielle ou nulle</b>	<b>Proline</b>

Tableau 1 : Classification des acides aminés suivant leur vitesse d'assimilation par *S. cerevisiae* (Lonvaud et al. 2010)

Depuis le millésime 2020, dans le cadre d'analyses globales de fermentescibilité, nous proposons le dosage différencié de chaque acide aminé en sus des déterminations classiques de l'azote assimilable. Les données cumulées confirment une très forte hétérogénéité. Au sein d'une même appellation, la teneur en arginine, l'un des principaux acides aminés retrouvé (et classé ci-dessus dans le groupe de ceux préférentiellement assimilés par *S. cerevisiae*) varie de 10 mg/L à près 800 mg/L. De même, les teneurs en méthionine peuvent atteindre la centaine de milligrammes alors que dans d'autres raisins il sera en deçà des limites de détection. Compte-tenu du rôle central des acides aminés dans les voies métaboliques des levures, quelles peuvent être les conséquences de telles différences ? Pour tenter de répondre à ces questions nous avons suivis les teneurs en acides aminés au cours de fermentations de lots nous paraissant relativement riches de certains acides aminés (en se concentrant sur ceux du groupe A et/ou ceux bien connus pour intervenir dans les révélations de certains arômes, les acides aminés soufrés en tête).

La figure 1 révèle la teneur en méthane-thiol présente en fin de FA dans un vin issu d'un moût présentant 85 mg/L de méthionine (Lot A). Sur cette même figure, en vert figure le dosage réalisé sur un vin issu d'un moût ne présentant initialement quasiment pas de méthionine. Le méthane-thiol est un composé conférant des arômes décrit comme « croupis » dans la littérature. Minimiser sa concentration est donc un objectif. Mais comme son nom l'indique, il s'agit également de la famille des thiols, famille de composés dans laquelle appartiennent aussi de nombreux composés d'intérêt pour lesquels l'intervention des acides aminés soufrés est également essentielle. Trouver le bon équilibre devient donc délicat et nécessite certainement de disposer d'informations les plus précises possibles (composition en acides aminés dont les acides aminés soufrés, précurseurs de thiols volatils, dérivés cystéinylés et glutathionylés...).

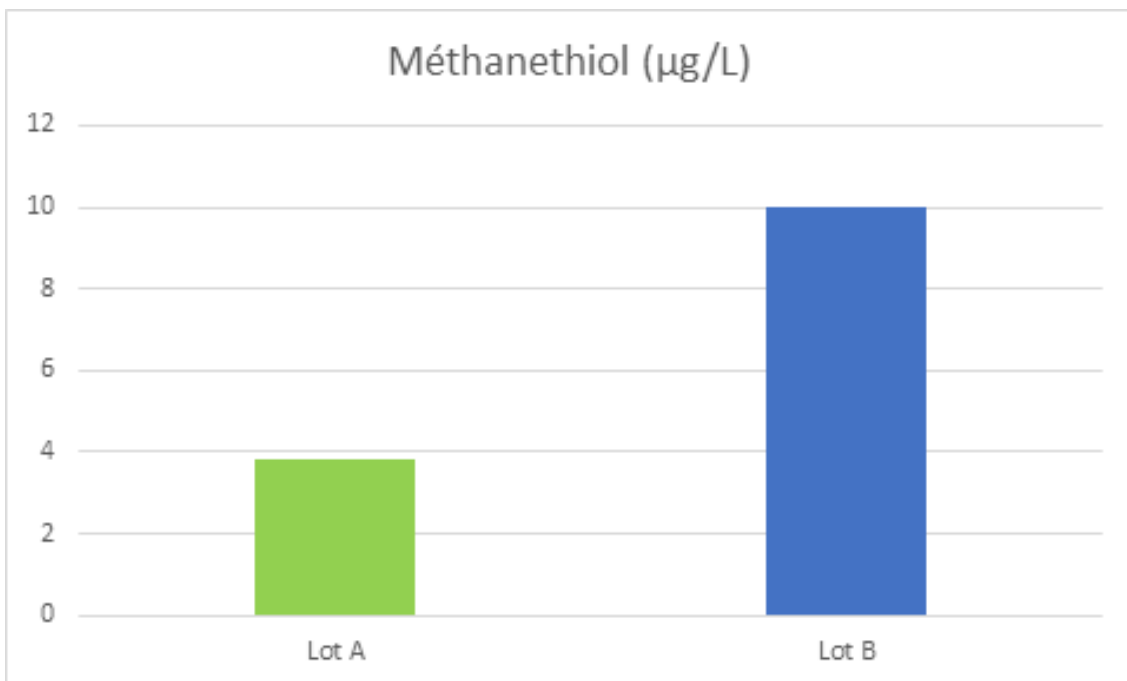


Figure 1 : Dosage de méthanethiol au laboratoire EXCELL dans deux vins d'un même site de production. Le vin en bleu est issu d'un moût ne présentant pas de méthionine et le vin en orange est un vin issu d'un moût présentant une teneur « record » en méthionine.

La figure 2 illustre aussi l'effet pernicieux que peut avoir les fortes valeurs d'acides aminés en comparant deux chromatogrammes. Le chromatographe en noir a été obtenu avec le vin issu d'un moût présentant plus de 400 mg/L d'arginine et plus de 100 mg/L d'alanine. Or ces deux acides aminés ont un point métabolique commun l' $\alpha$ -cétoglutarate, un composé également intimement lié à l'accumulation des acides gras. Relier ces observations avec la présence plus abondante des massifs de certains esters d'acides gras sur le chromatographe interroge et ce d'autant plus que les composés détectés sont connus pour conférer des notes lourdes « cireuses » aux vins dans lesquels ils sont présents, traits unanimement perçus lors de la dégustation comparative de ces deux lots.

Les apports azotés viticoles ou œnologiques ont été sans conteste des améliorations essentielles des processus ces dernières années et notamment les formulations offrant des voies nutritionnelles plus complexes que les simples sels d'ammonium. Pour accompagner ces progrès, et face aux évolutions climatiques, aux pratiques culturelles et des objectifs produits de plus en plus précis, nous avons souhaité incrémenter les classiques dosages d'azote assimilable par des dosages de chaque acide aminé. Les données cumulées ouvrent la porte à de nombreuses interrogations auxquelles les futurs suivis analytiques s'efforceront de répondre.

✓ **Résultats :**

Fig1 : Superposition des chromatogrammes obtenus :

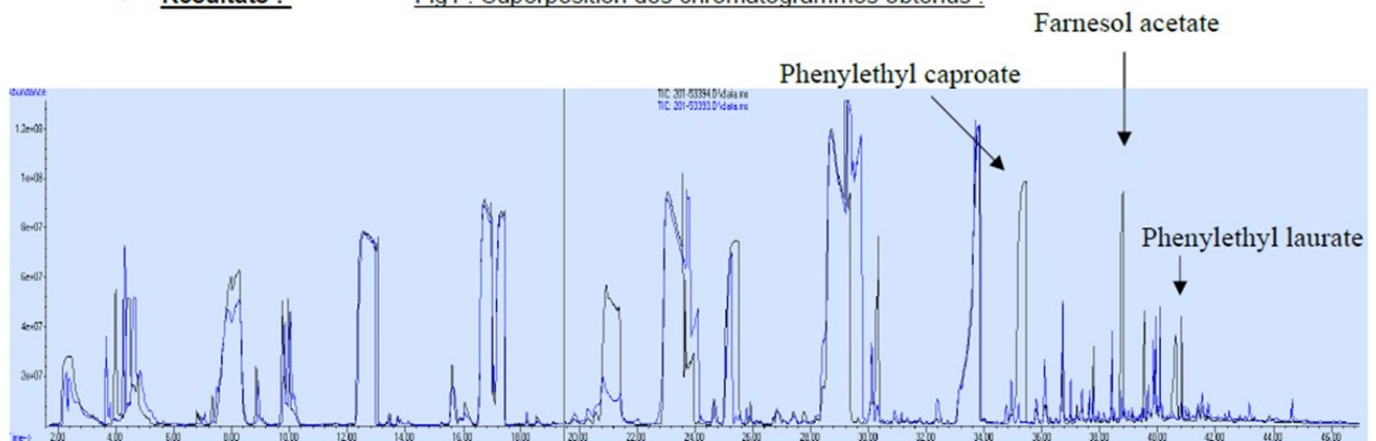


Figure 2 : Superposition de deux chromatogrammes de deux vins d'un même cépage et d'un même site de production et vinifiés de la même façon avec en noir le profil du vin issu d'un moût présentant des teneurs très élevées en arginine et alanine.

## 2- Azote résiduel à la fin de fermentation, un risque accru vis-à-vis de *Brettanomyces* ?

Comme évoqué ci-dessus, au cours de la vinification, la composition en éléments azotés évolue jusqu'à atteindre un équilibre en fin de processus. Toutefois, il est possible de retrouver un certain nombre de composants azotés pouvant être métabolisables en fin de fermentation. Les acides aminés font partis de ces éléments. Plusieurs études, généralement en conditions de laboratoire et sur un nombre restreint de souches, évoquent que la présence d'acides aminés libres en fortes concentrations favorise l'apparition de microorganismes d'altération tel que les *Brettanomyces bruxellensis*. A la manière des assimilations privilégiées évoquées par *Saccharomyces* ci-dessus, des études ont pu montrer que la majorité des acides aminés étaient métabolisables par *Brettanomyces* avec cependant des préférences en fonction des conditions en oxygène du milieu (Parente et al., 2017). En aérobie, la glutamine est l'acide aminé préférentiel alors qu'en anaérobie, il s'agit de l'acide glutamique et l'acide aspartique. Les autres acides aminés étant métabolisables dans une moindre mesure. Il a également été montré que les acides aminés aromatiques et branchés comme la proline et cystéine sont très peu consommés par *B. bruxellensis*. Rappelons cependant que des acides aminés peu métabolisables pour leurs composés azotés peuvent servir dans le cadre de la nutrition carboné comme l'alanine, la proline et l'acide glutamique (Crauwels., 2015) puisque les cellules sont capables d'extraire le groupe azoté pour disposer du squelette carboné (qui devient l'équivalent d'un sucre d'un point de vue du catabolisme). Le tableau ci-dessous reprend les données de Parente et al. 2017.

Condition	Category		
	Preferential	Secondary	Poor usable
O <sub>2</sub>	Glutamine	Arginine, aspartate, glutamate, leucine, threonine	Alanine, asparagine, cysteine, glycine, isoleucine, lysine, histidine, methionine, phenylalanine, proline, serine, tyrosine, tryptophan, valine
N <sub>2</sub>	Aspartate, glutamate, glutamine	Alanine, arginine, asparagine, serine, phenylalanine,	Cysteine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, histidine, methionine, proline, threonine, tryptophan, tyrosine, valine

Tableau 2 : Classification des acides aminés selon leur potentiel à favoriser la croissance de *Brettanomyces* (essais réalisés sur la souche GDB 248) en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose selon Parente et al. 2017.

Ainsi, il paraît pertinent de s'interroger sur les teneurs en acides aminés en sortie de fermentation, les phénomènes qui peuvent influencer ces concentrations et les répercussions possibles en termes de risque pour *Brettanomyces*.

La figure 3, présente le traitement de l'ensemble des analyses d'azote, dit assimilable, en fin de FML pour les vins rouges du millésime 2021 analysés au laboratoire en différenciant la part ammoniacale et la part organique. Observer que plus de 16% des vins présentent plus de 140 mg/L d'azote assimilable (valeur encore retenue par certains pour être suffisante dans un moût pour assurer un bon déroulement de sa fermentation) et que 50% des vins présentent des valeurs supérieures à 100 mg d'azote assimilable amène des interrogations. Nous constatons aussi que l'immense majorité de cet azote est sous forme d'acides aminés. La question qui s'impose alors est : que deviennent ces acides aminés durant l'élevage ?

Pour commencer à répondre à cette question, lors du millésime 2020, avec un client nous avons constitué en sortie de FML 3 lots distincts : 1 lot constitué des vins avec plus de 150 mg/L d'azote assimilable sous forme organique, 1 lot avec des vins présentant des teneurs comprises entre 100 et 150 mg/L d'azote assimilable sous forme organique et 1 lot avec des teneurs inférieures à 100 mg/L sous forme organique (4 barriques constituées chacun des lots).Après 10 mois de suivis (et 1 soutirage), les 3 lots présentés tous des teneurs inférieures à 100 mg/L d'azote et sans différences significatives entre les 3 lots (valeur moyenne de 55 mg/L). Cet essai aurait certainement nécessité plus d'attention et de contrôles analytiques (nous n'avons pas fait de contrôles des populations microbiennes) et les vins ne présentaient pas de caractère phénolé au terme de l'essai, mais le lot A qui initialement était aussi le lot avec le pH le plus élevé (pH = 3,92 vs pH = 3,84 pour le lot B et pH = 3,72 pour le lot C) était en fin de suivi celui qui présentait l'acidité volatile la plus élevée

(AV = 0,65 g/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vs AV = 0,59 mg/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour le lot B et AV = 0,44 g/L pour le lot C) et surtout celui qui combinait le plus le SO<sub>2</sub> (estimation réalisée en mesurant le TL35, il fallait environ 1 fois et demi plus de SO<sub>2</sub> total dans le lot pour obtenir 35 mg/L de SO<sub>2</sub> libre dans le lot A que dans le lot C). Partant du principe de Lavoisier « *rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme* », il est probable que les acides aminés consommés dans le lot A ont été utilisés dans des voies de métabolismes centraux pour produire des composés de type acides, aldéhydes ou cétones expliquant la hausse de volatile et la combinaison de SO<sub>2</sub>. Nécessairement réalisées par des microorganismes ces transformations ont forcément été bénéfiques à ces dernières pour de la maintenance cellulaire voire de la croissance.

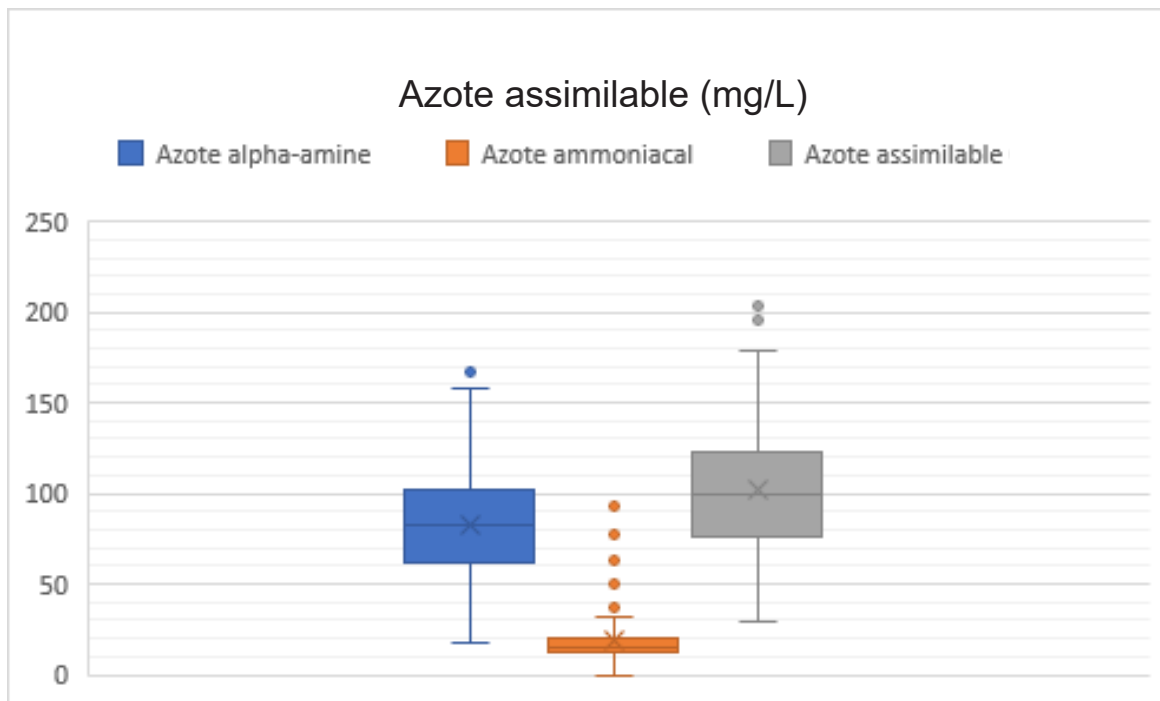
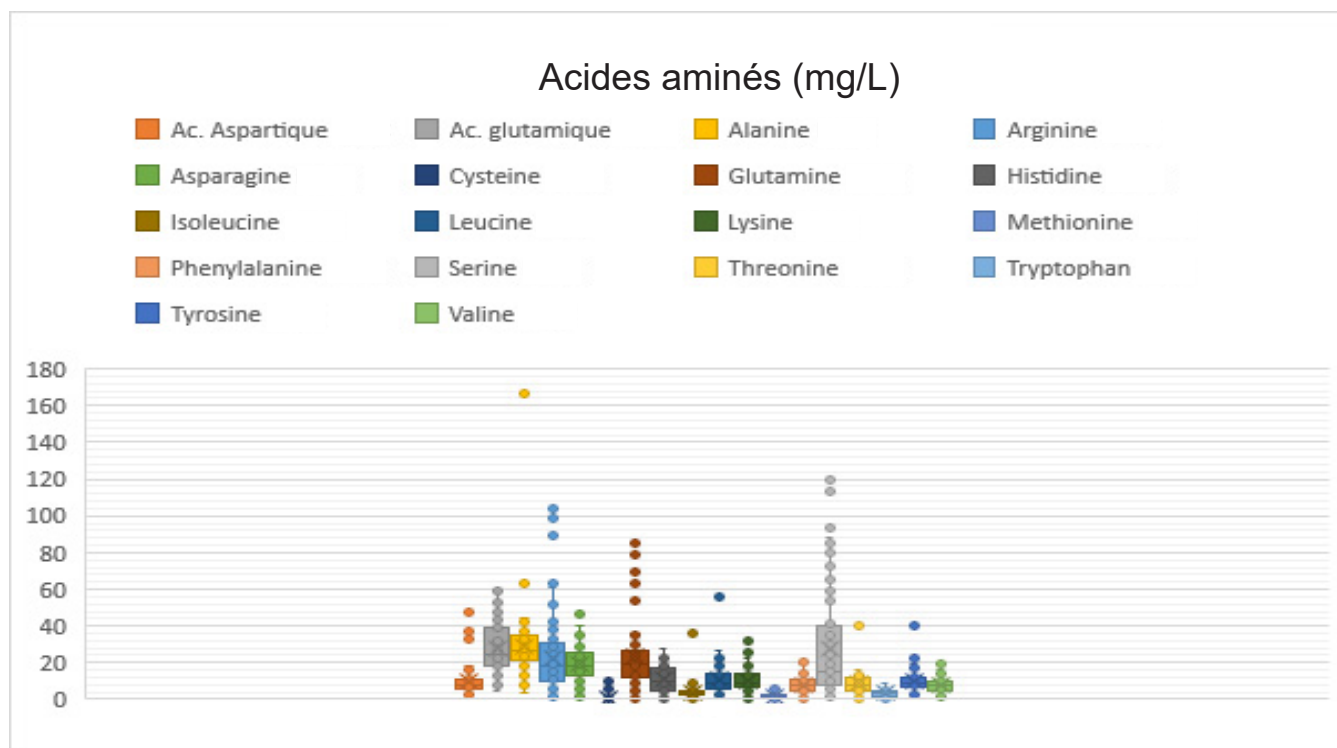


Figure 3 : Bilan des dosages d'azote assimilable sur vins rouges en sortie de FML lors du millésime 2021.

Le graphique 4 et le tableau 3 qui suit représentent les valeurs moyennes des acides aminés mesurées en fin de FML dans les vins rouges du millésime 2021.



	Asp	Glu	Ala	Asn	Cys	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Thr	Trp	Val
Minimum	0,9	4,43	3,45	0	0	0	0	0	2,12	0	0	0	0	0	0	0
Medianne	8,21	27,73	28,46	19,93	0	19,33	9,37	3,32	9,54	9,755	2,17	7,82	18,9	8,52	4	7,7
Maximum	48,92	60,1	166,7	46,43	8,2	85,18	27,2	35,5	56,2	32	5,74	20,79	119,66	40	8,7	20,83
Moyenne	10,621	29,592	29,463	20,161	0,255	23,103	10,15	4,058	10,923	10,645	2,178	8,237	30,499	8,975	3,959	8,518

Figure 4 et tableau 4 : bilan de tous les acides aminés dosés individuellement au laboratoire EXCELL sur les vins rouges en sortie de FML lors du millésime 2021.

La figure 5 se concentre sur les 4 acides aminés présents à la fois dans la première colonne et la seconde colonne du tableau de Parente et que nous pouvons donc, sur cette base, considérer comme étant les plus favorables au développement de *Brettanomyces*, à savoir la glutamine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'arginine. Ce camembert montre que ces 4 acides aminés (en bleu) représentent plus du tiers des acides aminés totaux sur les vins étudiés en fin de fermentation, offrant ainsi certainement des opportunités de développement pour *Brettanomyces*.

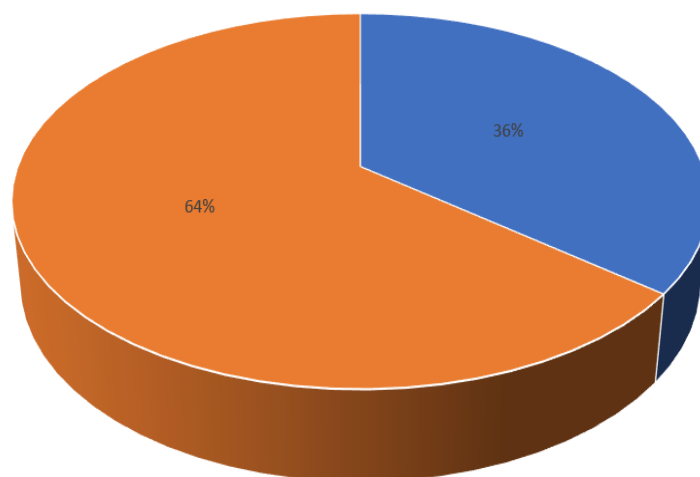


Figure 5 : Représentation du % moyen des 4 acides aminés estimés comme bénéfiques à *Brettanomyces* par rapport à l'ensemble de tous les acides aminés disponibles.

Généraliser le dosage des acides aminés sur vins en sortie de fermentations n'est certainement pas la solution miracle dans la gestion de la problématique mais associer les suivis des populations développées ces derniers temps à la compréhension des conditions de croissance de *Brettanomyces* dans les vins nous semble indispensable. En lien avec nos travaux sur le tréhalose, les esters d'acides phénoliques, la piste des acides aminés ouvrent une nouvelle voie dans cette compréhension. Indiquons aussi que ces travaux sont relativement liés à ceux réalisés par notre doctorant en thèse Paul Le Montagner sur les phénomènes de bio-adhésion des *Brettanomyces* sur la surface des matériels en cave, car dans de nombreuses niches écologiques il est décrit que les processus de bio-adhésion peuvent être liés aux disponibilités en acides aminés dans la matrice liquide d'origine des cellules.

## Conclusions et perspectives

L'azote est l'objet de nombreuses attentions tant viticoles qu'œnologiques. Ces liens font que toute action réalisée pour un objectif précis peut se répercuter sur d'autres phénomènes. Par exemple, la pulvérisation d'azote foliaire induit inexorablement des teneurs en composés azotés plus élevés, ce qui peut être bénéfique à la révélation des arômes mais attention, comme l'écrivait Montesquieu, « le mieux est l'ennemi du bien ». En voulant optimiser un paramètre, nous pouvons en déstabiliser d'autres. Cela peut être voulu ou subi, plusieurs études décrivent ainsi que l'évolution du climat, le raisonnement des traitements phytosanitaires...entraînent des stress hydriques et cryptogamiques de diverses natures et d'intensités variables et que les protéines sont des éléments centraux de résistance à ces stress. Les teneurs de ces dernières ont donc inexorablement augmenté ces dernières années.

Les deux exemples évoqués ici laisse présager que le dosage en routine des acides aminés, développé au laboratoire EXCELL, est un outil perspicace pour mieux appréhender ces phénomènes. Nous recommandons ces dosages sur raisins à l'approche des vendanges ou sur moût durant les phases pré-fermentaires notamment lors de process très protecteurs de l'oxygène pour les vins blancs et rosés et plus spécifiquement lors de populations indigènes élevées de levures sur raisins ou bien lors d'emploi de souches de non-Saccharomyces dont certaines sont connues pour être particulièrement friandes d'azote.

Dans le cas de la gestion préventive des contaminations par *Brettanomyces*, cela permet d'estimer des réserves en nutriments qui rendront certainement certains lots plus propices aux développements que d'autres. Cette gestion préventive concentre les efforts de stabilité sur les lots avec le plus de résidus azotés (indiquons ici que le partenaire ayant réalisé les essais d'assemblage préalablement évoqués traite désormais tous les vins avec plus de 150 mg/L d'azote en sortie de FML au chitosane avant leur entonnage avec un relatif succès).

D'un point de vue pratique deux formules analytiques sont proposées au laboratoire EXCELL pour le dosage des acides aminés. Une première formule avec alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine, asparagine, glutamine, tryptophane, ornithine qui est adaptée à la thématique *Brettanomyces* ainsi qu'à celles de la problématique des goûts de souris (où ces composés interviennent également très certainement). Pour la thématique de pilotage des fermentations, afin de disposer d'un signal suffisamment robuste pour la cystéine nous sommes contraints de réaliser une dérivation spécifique du composé. Il s'agit donc d'une seconde formule comprenant toute la liste précédente plus la cystéine et les différents dérivés cystéinylés.

Pour plus de renseignements, veuillez contacter : [secretariat@labexcell.com](mailto:secretariat@labexcell.com)