# RÉSOLUTION OIV-OENO 370-2012

# LIGNES DIRECTRICES POUR LA CARACTERISATION DES LEVURES DE VINIFICATION DU GENRE SACCHAROMYCES ISOLEES DE MILIEUX VITIVINICOLES

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU l'article 2, paragraphe 2 IV de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin,

VU le Plan Stratégique de l'OIV,

SUR PROPOSITION du groupe d'experts « Microbiologie »,

DÉCIDE d'adopter les lignes directrices relatives aux critères pour la caractérisation des levures *Saccharomyces* issues de milieux vitivinicoles :

## Lignes directrices pour la caractérisation des levures de vinification du genre Saccharomyces

TABLE CONTENT

Chaque paragraphe des sections 1 et 2 contient les critères standards pour la caractérisation des levures de vinification (*S. cerevisiae*) et indique, le cas échéant, le type de technologie du vin.

## « PRÉAMBULE »

Il ne fait aucun doute que les techniques œnologiques de base ont connu une évolution rapide au cours des décennies précédentes, impulsées par l'augmentation des exigences en matière de qualité des vins et de conditions de production hygiéniques (sécurité).

De nouvelles biotechnologies ont été développées au fil des ans afin d'expliquer l'importance des microorganismes et leurs effets sur les caractéristiques sensorielles des vins. La plupart des vinificateurs emploient des levains sélectionnés en fonction de différents critères qui assurent également le contrôle du processus de fermentation alcoolique.

Pendant de nombreuses années, ces levains ont été sélectionnés avec une préférence portée sur les levures *Saccharomyces* au sein de la microflore naturelle du raisin, du fait de leurs caractéristiques plus adaptées, en particulier leur haut degré de



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

résistance à l'alcool. De nos jours, des raisons œnologiques fondamentales soulignent l'importance d'indiquer l'origine géographique et/ou le lieu où elles ont été isolées et/ou la variété de raisin à l'origine des souches de levures choisies en tant que levains.

Le genre *Saccharomyces* et certaines de ses espèces *(S. cerevisiae*, *S. bayanus*), semblent idéales pour la réalisation de la fermentation alcoolique en raison d'une adaptation évolutive aux fortes concentrations en sucre des moûts et leur conversion ultérieure en éthanol, en dioxyde de carbone et en un grand nombre de composés organoleptiques. Les variations entre et au sein des espèces offrent la possibilité d'amplifier la caractérisation des souches, certaines d'entre elles résultant très utiles en environnements industriels.

Les progrès enregistrés par les techniques analytiques destinées à la recherche des composés chimiques dans la fermentation des moûts permettent d'avancer en matière de compréhension de la fonctionnalité des souches sous différentes conditions de fermentation. Et cela sans oublier que la biologie moléculaire n'est pas restée indifférente aux objectifs fixés par l'industrie en matière d'œnologie moderne, et comprendra des utilisations ciblées des technologies « -omiques » (génomiques, transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques).

En ce sens, la compréhension du génome complet de certaines espèces de *Saccharomyces* et les fonctions spécifiques de milliers de gènes rendront possibles de nouvelles avancées scientifiques, en particulier quant à leur physionomie et leur fonctionnalité au cours de la fermentation.

Toutes les recherches effectuées sur les levures en tant qu'entités complexes rendront les études de caractérisation plus aisées et donneront des résultats positifs dans le champ de l'œnologie moderne avec l'application de nouvelles souches de levures sélectionnées.

En outre, les critères de sélection suivants se centrent principalement sur la caractérisation des levures *Saccharomyces*, en ne perdant pas de vue l'augmentation de l'intérêt porté à l'isolation, la caractérisation et l'utilisation de levures appartenant au groupe des levures « non-*Saccharomyces* », qui constituent une part importante de la flore levurienne présente sur les raisins et prennent une part active lors du déclenchement des fermentations alcooliques. Bien qu'elles affectent souvent négativement sur la fermentabilité et sur les arômes et goûts résultants, certaines de ces levures apportent également des composés aromatiques s'avérant positifs et qui enrichissent la complexité des vins. Les lignes directrices pour la caractérisation de levures de vinification non-*Saccharomyces* seront présentées dans une autre résolution spécifique.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Cette résolution recouvre les levures du genre *Saccharomyces* et leurs hybrides respectifs, et comporte une compilation de critères de caractérisation des levures s'avérant utiles lors des processus d'isolation et de caractérisation des levures de vinification pour une production de vin orientée vers la qualité. Ils sont groupés en critères technologiques et organoleptiques. Ceux ayant un impact sur la santé humaine sont également présentés. En fonction de l'expression de différents caractères variétaux ou de styles de vins, ces critères peuvent revêtir des importances différentes pour différents moûts, et leur respect n'est donc pas obligatoire. Étant donné que les styles de vin évoluent avec le temps, la présente liste doit être considérée comme une liste non exhaustive pouvant être élargie dans le futur.

Au cours des processus de caractérisation, le testage de certains critères implique l'utilisation de milieux de culture complexes ou synthétiques. Ces milieux contribuent à obtenir une première information sur les propriétés des levures ; ces informations doivent cependant être considérées comme des indicateurs, les souches de levure pouvant réagir de manière différente dans le moût de vin au cours de la fermentation, des essais devant donc également être effectués sur les moûts.

Les processus d'élaboration des levures sèches actives (tels que la nutrition, le séchage) sont susceptibles d'influencer les performances de la levure, et des essais avec la forme sèche doivent donc également être réalisés.

Les caractérisations des levures incluent aussi bien les aspects relatifs à une production de vins de haute qualité que ceux relatifs au respect de la réglementation en termes de sécurité des aliments. Les critères ayant une influence sur les aspects relatifs à la sécurité alimentaire ne sont pas indiqués d'une manière spécifique car les réglementations nationales et/ou internationales peuvent différer d'un État membre à l'autre. La personne ou l'entreprise en charge de la sélection est donc dans l'obligation de prendre ces exigences légales en considération.

Les lignes directrices peuvent également être appliquées pour tester les cultures de levures séchées. Ces levures sèches doivent être réactivées et inoculées selon les instructions du fabricant.

# 1. CARACTÉRISTIQUES AFFECTANT LA VINIFICATION

## 1.1. CARACTÉRISTIQUES TECHNOLOGIQUES GÉNÉRALES

### 1.1.1. Pouvoir de fermentation



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

#### 1.1.1.1. Domaine d'application

Critère standard de caractérisation de souches possédant des capacités de fermentation.

#### 1.1.1.2. Principe

Détermination de la quantité maximum de sucre qu'une levure est capable de fermenter dans un milieu riche en sucre.

#### 1.1.1.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Balance analytique, précision à 0,1 g
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller

#### 1.1.1.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 250 $g \cdot l^{-1}$ (levures pour la vinification des vins blancs), ou 300 $g \cdot l^{-1}$ (pour les souches de levure destinées à la vinification des vins rouges, notamment dans les régions chaudes). Afin de déterminer un comportement général et comparable de la souche, des milieux synthétiques de composition semblable sont utilisés à la place. (Annexe 1 pour les milieux synthétiques)
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

#### 1.1.1.5. Procédure

Les cultures de levure à analyser sont obtenues à l'aide de 3 passages successifs en milieu liquide pendant 48 heures jusqu'à obtention de populations de 108 UFC $ml^{-1}$. Le



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

volume du milieu utilisé est de 5 ml et la quantité d'inoculum transférée lors de chaque passage est de 100 µl.Transférer ensuite 1 ml d'inoculum de levure dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml contenant 50 ml du milieu de fermentation avec 250 $g \cdot l^{-1}$ de sucre. Obturer la fiole avec une valve Müller. Suivre la microvinification par analyse gravimétrique en conditions isothermes à 25°C. Les levures de vinification doivent être capables de fermenter complètement les moûts avec des teneurs en sucre de 200-250 g/L (approximativement 11,5-14,5 % v/v d'éthanol).

#### 1.1.1.6. Calculs

Pouvoir de fermentation = 2,5 poids·Δ

#### 1.1.1.7. Bibliographie


1. Kunkee, R. E.; Goswell, R. W. Table wines. In: Alcoholic beverages. Ed. A. H. Rose. Academia Press, London, **1977**, pp. 315-386.
2. Vaughan-Martini, A.; Martín, A. Determination of ethanol production. In: The yeasts. A taxonomic study. Eds. C. P. Kurtzman, J. W. Fell, Elsevier, **1998**, p 107.


### 1.1.2. VIGUEUR DE FERMENTATION ET CINÉTIQUE DE FERMENTATION À CERTAINES TEMPÉRATURES

#### 1.1.2.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification.

#### 1.1.2.2. Principe

La vigueur de fermentation, exprimée en termes de vitesse à laquelle la levure débute la fermentation, est exprimée en grammes de $CO_2$ produit 2-3 jours après le début de la fermentation. Suivre la courbe de cinétique de fermentation (en grammes de $CO_2$ produit ou grammes de sucre fermenté vs. temps) afin de sélectionner les souches présentant un début de fermentation rapide, sans pics de chaleur et avec une bonne performance en fin de fermentation. Une bonne cinétique de fermentation permet de réduire la consommation d'énergie pour le contrôle de la température. La température est l'un des facteurs qui varient d'un processus de vinification à l'autre. Elle influence la production d'acidité volatile et de métabolites de fermentation, mais également la viabilité de la levure.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 1.1.2.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Balance analytique, précision à 0,1 g
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller

### 1.1.2.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 250 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h dans le milieu YEPD afin d'obtenir la culture mère.

### 1.1.2.5. Procédure

Les cultures de levure à analyser sont obtenues en inoculant 100 µl de culture mère dans 5 ml de milieu frais et incubé pendant 48 avec 3 passages successifs. Le milieu de culture final devrait contenir $10^8$ UFC $ml^{-1}$. La concentration de levure au moment de l'inoculation dans le milieu donné devrait être approximativement de $10^6$ cellules vivante / $ml^{-1}$

Effectuer le suivi de la microvinification par analyse gravimétrique comme indiqué en 1.1.1.5, mais à des températures de fermentation différentes (15°C, 20°C, 25°C et 30°C). Établir des courbes thermodynamiques à différentes températures exprimées en g de $CO_2$ libérés par jour et étudier l'effet de la température sur le ralentissement ou l'augmentation de la vitesse de fermentation.

### 1.1.2.6. Calculs

Une fois les courbes établies, les paramètres suivants sont étudiés pour chaque



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

souche : la durée de la phase latente, la pente de la phase exponentielle, la durée de la phase stationnaire, et la pente et durée de la phase finale. Déterminer la plage de valeurs optimale pour la souche étudiée en comparant les courbes obtenues pour chaque température.

#### 1.1.2.7. Bibliographie


1. Boned, F.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Selección de levaduras vínicas en la D. O. Bierzo. Vitivinicultura, 1992, 3, 37.
2. Calderón, F.; Gutierrez-Granda, M. J., Suárez-Lepe, J. A. Isolation, identification and physiological characterization of indigenous yeast of Chardonnay grapes from Somontano. Am. J. Enol. Vitic. 1994, 45, 368.
3. Suárez-Lepe, J. A. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed Mundiprensa, Madrid, 1997, 23-24.


### 1.1.3. RÉSISTANCE AU $SO_2$

#### 1.1.3.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification.

#### 1.1.3.2. Principe

Le dioxyde de soufre ($SO_2$) est un antioxydant et un agent bactériostatique utilisé en œnologie afin d'empêcher les oxydations, d'obtenir une stabilisation microbiologique et de permettre la caractérisation des levures de fermentation dans les fermentations spontanées. Lors de la caractérisation des levures de vinification, vérifier que les souches peuvent assurer une fermentation complète à des concentrations supérieures à 30 $mg \cdot l^{-1}$ en dioxyde de soufre libre et 50 $mg \cdot l^{-1}$ en dioxyde de soufre total. Des concentrations en dioxyde de soufre plus élevées, jusqu'à 100-150 $ml^{-1}$, sont recommandées selon certains auteurs (Ribérau-Gayon et al. 2003).

#### 1.1.3.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Balance analytique, précision à 0,1 g
- Chambre à flux laminaire



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Pipettes à embouts stériles
- Plaques de Petri stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller

### 1.1.3.4. Réactifs et produits

#### 1.1.3.4.1.

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1). Le pH est ajusté à 3,5 avec de l'acide tartrique.
- Métabisulfite de potassium
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD. pour obtenir la culture mère.

Les populations de levures sont pré cultivées en inoculant 100 µl de culture mère dans 5 ml de milieu frais et incubé pendant 48 avec 3 passages successifs. Le milieu de culture final devrait contenir $10^8$ UFC $ml^{-1}$. La concentration de levure au moment de l'inoculation dans le milieu donné devrait être approximativement de $10^6$ cellules vivante / $ml^{-1}$

#### 1.1.3.4.2.

- Milieu composé d'un moût de raisins gélosé stérile. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1). Le moût de raisins, stérilisé en autoclave à 100°C pendant 20 minutes, est ajouté avec une quantité égale de solution stérile aqueuse contenant l'agar à 4 %. Le pH final du milieu est de 3,5.
- Métabisulfite de potassium
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 1.1.3.5. Procédure

#### 1.1.3.5.1.

Doser 50 ml de moût stérile (pH 3,5) avec du métabisulfite de potassium à raison de 50 $mg \cdot l^{-1}$ de $SO_2$ total. Préparer un autre essai de contrôle sans métabisulfite de potassium. Inoculer ensuite les deux essais avec 1 ml de la culture synchronisée de la souche choisie. Suivre la quantité de $CO_2$ libérée par jour pendant la fermentation et établir la courbe de fermentation. Déterminer le pouvoir de fermentation. Comparer le pouvoir de fermentation de la levure en présence et en l'absence de $SO_2$. Analyser les déviations de la courbe de fermentation en présence de $SO_2$. Il est fortement recommandé d'étudier l'effet des concentrations en $SO_2$ plus élevées ainsi que celui de la température.

#### 1.1.3.5.2.

L'on ajoute au milieu des quantités variables de solution stérile contenant du dioxyde de soufre, telle que le métabisulfite de potassium, en fonction des doses de dioxyde de soufre analysées, allant de 50 à 300 ppm. La régulation positive est représentée par le même milieu, sans dioxyde de soufre. Les souches sont cultivées 24h en milieu YEPD, elles sont ensuite inoculées dans le milieu à une concentration d'environ 104 cellules/ml. Après incubation à 26°C pendant 48h, la croissance de la levure (positive/négative) à la concentration différente analysée est examinée par comparaison à la régulation positive. Le degré de résistance de la levure au dioxyde de soufre constitue la dose maximale à laquelle la levure connaît une croissance importante.

### 1.1.3.6. Bibliographie


1. Morata, A.; Calderón, F.; Colomo, B.; González, M. C., Uthurry, C.; Varela, F.; Yeramian, N.; Suárez, J. A. Primeros criterios de selección de levaduras para la vinificación en tinto. Semana Vitivinícola. 2005, 3057, 806-809
2. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV. MA-F-AS323-04-DIOSOU
3. Ribérau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B, Lonvaud A. Trattato di enologia, Vol. I.. Edagricole, Bologna, 2003, 193-220.
4. Romano P., Fiore C., Capece A. Metodi per la caratterizzazione fenotipica di lieviti




Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

vinari In: Microbiologia del vino. Eds. Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. Casa Editrice Ambrosiana - Milano, Italia, 2005. 435-450.

## 1.1.4. RÉSISTANCE AU CUIVRE

### 1.1.4.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification.

### 1.1.4.2. Principe

Le cuivre apparaît dans le moût et le vin suite à l'utilisation de composés contenant du cuivre pour lutter contre les ravageurs du vignoble. Les fortes concentrations en cuivre dans le moût ont des effets toxiques sur la croissance et l'activité de fermentation des cellules de levure qui ont d'emblée développé certains mécanismes de défense.

### 1.1.4.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Balance analytique, précision à 0,1 g
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Plaques de Petri stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller

### 1.1.4.4. Réactifs et produits

#### 1.1.4.4.1.

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Sulfate de cuivre



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD pour obtenir la culture mère. .

Les populations de levures sont pré cultivées en inoculant 100 µl de culture mère dans 5 ml de milieu frais et incubé pendant 48 avec 3 passages successifs. Le milieu de culture final devrait contenir $10^8$ UFC $ml^{-1}$. La concentration de levure au moment de l'inoculation dans le milieu donné devrait être approximativement de $10^6$ cellules vivante / $ml^{-1}$

1.1.4.4.2.

- Milieu composé d'un moût de raisins gélosé stérile. Le moût de raisins, stérilisé en autoclave à 100°C pendant 20 minutes, est ajouté avec une quantité égale de solution stérile aqueuse contenant l'agar à 4 %. Le pH final du milieu est de 3,5. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Sulfate de cuivre
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

### 1.1.4.5. Procédure

La résistance au cuivre des souches de levure est évaluée à l'aide de microvinifications effectuées selon les procédures décrites en 1.1.1.5, et en utilisant le moût de raisins contenant différents niveaux de sulfate de cuivre afin d'atteindre des concentrations de cuivre entre 20 et 500 µmol/l. Les microvinifications ne contenant pas de sulfate de cuivre sont effectuées en tant qu'essais de contrôle. Après inoculation, les fioles sont obturées avec des valves Müller et pesées quotidiennement afin de suivre la perte de poids provoquée par l'évolution de $CO_2$. La concentration en cuivre provoquant une diminution importante de l'évolution de $CO_2$ par rapport à l'essai de contrôle indique le niveau de résistance au cuivre dans la souche de levure analysée.

La résistance au cuivre peut également être déterminée par analyse par plaques, comme indiqué au paragraphe 1.1.3.5.2. Les doses de cuivre, ajoutées sous forme de sulfate de cuivre, allaient de 20 à 500 µmol/l par rapport à l'essai de contrôle exempt du composé antimicrobien.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

#### 1.1.4.6. Bibliographie

1. Romano P., Fiore C., Capece A. Metodi per la caratterizzazione fenotipica di lieviti vinari In: Microbiologia del vino. Eds. Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. Casa Editrice Ambrosiana - Milano, Italia, 2005. 435-450.

### 1.1.5. FACTEUR KILLER. PHÉNOTYPES "K" OU "N"

#### 1.1.5.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification.

#### 1.1.5.2. Principe

Les levures à caractère killer peuvent croître au détriment d'autres levures dans des conditions œnologiques. Les souches sont capables de produire la toxine killer (phénotype "M+R+") et qui y sont résistantes. L'utilisation de souches killer a été suggérée comme une technique pouvant favoriser l'implantation de levures inoculées dans les fermentations viniques. Toutefois, les conditions de vinification, notamment dans les vins rouges, empêchent fréquemment d'atteindre le degré de toxicité que possède la toxine killer en conditions in vitro. Ceci vaut tout particulièrement pour les vins rouges.

#### 1.1.5.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Plaques de Pétri

#### 1.1.5.4. Réactifs et produits

##### 1.1.5.4.1.

- Milieu solide pour la culture de levures (YEPD) tamponné



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Bleu de méthylène
- Souches de levure de phénotype sensible (S) et killer (K2)

#### 1.1.5.4.2.

- Milieu synthétique gélosé à base de pomme de terre et de dextrose (PDA), tamponné à pH 5,6.
- Bleu de bromophénol

### 1.1.5.5. Procédure

#### 1.1.5.5.1.

La souche à analyser est cultivée en milieu solide tamponné et contenant du bleu de méthylène, sur le gazon d'une souche sensible (phénotype "S"), sur lequel une strie de la souche à analyser est ensemencée. Une autre strie de la souche à analyser est ensemencée de la même manière sur le gazon d'une souche killer.

#### 1.1.5.5.2.

Une anse des levures analysées est inoculée en milieu PDA, les plaques étant ensuite incubées à 26°C pendant 3-5 jours. Les souches de levure formant des colonies de couleur bleu-violet sont considérées comme des souches killer, tandis que les souches formant des colonies de couleur grise sont des souches sensibles.

L'activité killer peut également être évaluée par la méthode de diffusion sur plaque de gélose. Plus précisément, la sensibilité de la levure à toxine killer est évaluée en répandant environ 105 cellules de la levure dont la sensibilité doit être analysée sur des plaques contenant 25 ml de milieu à pH bas bleu (gélose YEPD avec 0,003 % de bleu de méthylène (w/v), tampon citrate/phosphate 0,1 M à pH 4,5). Après propagation de la souche sensible, l'activité killer est examinée par inoculation dans une souche killer liquide (sous forme de goutte contenant 108 cellules/ml) ou solide (striée) sur une souche sensible. Les plaques sont incubées à 25°C pendant 4-5 jours. L'activité killer est mesurée selon la présence et la dimension de la zone d'inhibition.

### 1.1.5.6. Bibliographie

1. Suárez-Lepe, J. A. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Mundiprensa, Madrid, 1997, 71-92.

2. Rosini, G. The occurrence of killer characters in yeasts. *Can. J. Microbiol.*, 1983, 29, 1462–1464.

## 1.1.6. MODE DE CROISSANCE EN MILIEU LIQUIDE

### 1.1.6.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification.

### 1.1.6.2. Principe

Le mode de croissance des levures pendant la fermentation est une caractéristique technologique importante car il peut avoir un impact sur la gestion du processus de fermentation. En effet, les cellules de levure peuvent présenter un mode de croissance différent (telle que les cellules simples ou globales) selon l'hydrophobicité des parois cellulaires. En général, une croissance dispersée et une sédimentation rapide sont nécessaires dans les souches de levure de vinification sélectionnées pour la procédure œnologique standard.

### 1.1.6.3. Appareillage

- Autoclave
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la culture cellulaire
- Spectrophotomètre
- Vortex

### 1.1.6.4. Réactifs et produits

- Milieu liquide YEPD

### 1.1.6.5. Procédure

Après incubation en milieu YEPD à 25°C pendant 3 jours, la densité optique des



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

cultures cellulaires de levure est mesurée à 620 nm peu de temps après une forte agitation (D) et après 10 minutes ($D_1$). Les valeurs du rapport $R = D_1x100/D$ permettent d'identifier les souches de levure poussiéreuse (R = 100 %) ou les souches de levure légèrement floculante (R allant de 70 à 100 %).

#### 1.1.6.6. Bibliographie

1. Romano P., Fiore C., Capece A. Metodi per la caratterizzazione fenotipica di lieviti vinari In: Microbiologia del vino. Eds. Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. Casa Editrice Ambrosiana - Milano, Italia, 2005. 435-450.

## 1.1.7. PRODUCTION DE MOUSSE

### 1.1.7.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification.

### 1.1.7.2. Principe

La formation de mousse par les levures est un phénomène fonction de la souche, et qui se produit pendant la fermentation vinique selon l'hydrophobicité des parois cellulaires. L'absence de production de mousse ou une faible formation de mousse dans les fermentations viniques est considérée comme une caractéristique positive.

### 1.1.7.3. Appareillage

- Autoclave
- Chambre à flux laminaire
- Membranes stériles 0,2 µm
- Balance analytique
- Éprouvette graduée (50 ml)
- Lumière infrarouge

### 1.1.7.4. Réactifs et produits

- Milieu synthétique (Palmieri et al, 1996)



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

#### 1.1.7.5. Procédure

La capacité des levures à produire de la mousse est évaluée par mesure de la flottation. Le milieu synthétique est inoculé à une concentration de 0,2 mg de cellule (poids sec)/ml, puis versé dans l'éprouvette graduée, dont l'extrémité supérieure est reliée à un récipient en verre adapté pour contenir la mousse. Ainsi, le flux d'air (6-7 ml/s) est insufflé au fond de l'éprouvette. Afin d'évaluer la capacité de la souche de levure à produire de la mousse, la concentration en cellules est mesurée au début ($C_p$), après la formation de mousse ($C_r$) et à l'intérieur des échantillons d'absorption de la mousse ($C_s$) (1 ml chacun) par lumière infrarouge jusqu'à obtention d'un poids constant. La capacité de la souche de levure à produire de la mousse est calculée à l'aide de la formule suivante :

- $Flot\% = \square(C_p - C_r)/C_s\square \times 100$

#### 1.1.7.6. Bibliographie


1. Palmieri M.C., Greenhalf W., Laluce C. Efficient flotation of yeast cells grown in batch culture. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 50: 248-256.
2. Romano P., Fiore C., Capece A. Metodi per la caratterizzazione fenotipica di lieviti vinari In: Microbiologia del vino. Eds. Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. Casa Editrice Ambrosiana - Milano, Italia, 2005. 435-450.


## 1.2. CARACTÉRISTIQUES TECHNOLOGIQUES POUR LA VINIFICATION DES VINS BLANCS

### 1.2.1. CAPACITÉ DE FERMENTER DES MOÛTS FORTEMENT CLARIFIÉS AVEC DE FAIBLES TENEURS EN AZOTE ASSIMILABLE

#### 1.2.1.1. Domaine d'application

Production de jeunes vins blancs à partir de variétés à arôme neutre.

#### 1.2.1.2. Principe

Afin d'améliorer l'arôme du vin pour les variétés de raisin à arôme neutre, les levures choisies généralement utilisées sont celles produisant des esters pendant la fermentation pour augmenter les arômes secondaires. La production de ces composés



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

aromatiques peut être augmentée en fermentant des moûts fortement clarifiés, qui peuvent cependant entraîner des arrêts fermentaires. Il convient de caractériser des souches capables de fermenter à des taux d'azote assimilable d'environ 100 $mg \cdot l^{-1}$.

### 1.2.1.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller

### 1.2.1.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Le NFA/YAN est réglé à 100 $mg \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1)
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

### 1.2.1.5. Procédure

Effectuer un suivi gravimétrique de la cinétique de fermentation dans des conditions de microvinification et avec de faibles concentrations en NFA/YAN connues. Puisqu'il y a un risque d'arrêts fermentaires, la phase finale de fermentation doit être étudiée à l'aide des courbes.

### 1.2.1.6. Bibliographie

1. Suárez-Lepe, J. A. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed Mundiprensa, Madrid, 1997, 28-40.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

# 1.3. CARACTÉRISTIQUES TECHNOLOGIQUES POUR LA VINIFICATION DES VINS ROUGES

## 1.3.1. PERFORMANCE EN FIN DE FERMENTATION DANS LES MOÛTS RICHES EN SUCRES. RÉSISTANCE AU STRESS PENDANT LA FERMENTATION

### 1.3.1.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges à teneur élevée en alcool

### 1.3.1.2. Principe

Détermination du pouvoir de fermentation maximal d'une levure dans un milieu à forte teneur en sucres. Lors de la production de vins rouges, notamment dans les régions chaudes, et pour obtenir de bonnes maturations polyphénoliques, l'on peut atteindre des concentrations en sucre qui produisent des vins de 14,5-15,5 % v/v d'alcool. Le "stress de fermentation" est un terme qui recouvre les problèmes rencontrés en fin de fermentation, principalement dus à un manque en oligo-éléments et à l'association synergique de la toxicité causée par l'éthanol. Ceci intervient fréquemment dans les étapes finales de la fermentation, en particulier dans les moûts rouges à forte teneur en sucre. Ce processus peut être imité en laboratoire en utilisant des fermentations auxquelles sont ajoutés des acides gras saturés à chaîne courte (C10), qui saturent les membranes biologiques et créent une situation où la nutrition de la levure devient difficile, situation semblable à celle qui intervient lors de fins de fermentation compliquées.

### 1.3.1.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Balance analytique, précision à 0,1 g
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

#### 1.3.1.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Acide n-décanoïque

#### 1.3.1.5. Procédure

Suivi gravimétrique des microfermentations à taux élevés d'acide n-décanoïque (150-200 $mg \cdot l^{-1}$). La cinétique est étudiée en utilisant des souches de contrôle.

#### 1.3.1.6. Bibliographie

1. Morata, A.; Calderón, F.; Colomo, B.; González, M. C.; Suberviola, J.; Suárez, J. A. Mejora de la cinética fermentativa en la vinificación en tinto: Levaduras resistentes a estrés fermentativo. Tecnología del vino, 2004, 15, 39-45

### 1.3.2. AUTOLYSE ET LIBÉRATION DE POLYSACCHARIDES DE LA PAROI CELLULAIRE DES LEVURES

#### 1.3.2.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges vieillis par élevage sur lies par libération de polysaccharides.

#### 1.3.2.2. Principe

L'utilisation des levures sélectionnées spécialement pour l'élevage sur lies permet de trouver celles présentant la meilleure rapidité d'autolyse et libérant le plus de polysaccharides spécifiquement destinées à la production de vins rouges vieillis sur lies. Dans les vins, ces polysaccharides améliorent la stabilité colloïdale et la couleur

#### 1.3.2.3. Appareillage

- Stérilisateur



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer
- Bioréacteur
- Lyophilisateur
- Agitateur orbital
- Centrifugeuse
- Appareil CLHP-IR
- Colonne pour la chromatographie à exclusion moléculaire

### 1.3.2.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Milieu modèle pour étudier l'autolyse (solution tampon d'alcool et d'eau)
- Éluant : $NaNO_3$ (0,1 M)
- 96 % v/v d'éthanol
- HCl concentré
- Test enzymatique pour la détermination du glycérol

### 1.3.2.5. Procédure

Les polysaccharides contenus dans les autolyses de souches de levure sont extraits par précipitation en milieu apolaire acide (éthanol : HCl). Ils sont ensuite lavés successivement avec de l'éthanol et centrifugés à 9000 t/mn, puis le surnageant est éliminé. Enfin, l'échantillon est resuspendu à 0,1 M $NaNO_3$, filtré (0,45 µm) et réfrigéré jusqu'à l'analyse CLHP-IR. Choisir des levures à forte capacité de libération de polysaccharides en peu de temps.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 1.3.2.6. Bibliographie

1. Suárez-Lepe, J. A.; Morata, A.; Calderón, F.; Somolinos, S.; González, M.C.; Colomo, B. Utilización de levaduras seleccionadas en la crianza sobre lías de vinos tintos. Nuevo método de crianza sobre lías. Tecnología del vino**,** 2005, 26, 57 -61
2. Suárez-Lepe, J. A.; Morata, A.; Calderón, F.; Somolinos, S.; González, M.C.; Colomo, B. Utilización de levaduras seleccionadas en la crianza sobre lías de vinos tintos. Nuevo método de crianza sobre lías. Alimentación, Equipos y Tecnología, 2005, 207, 39-43.

## 1.3.3. PRODUCTION DES ALCOOLS DE SUCRE

### 1.3.3.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 1.3.3.2. Principe

Les 2,3-butanediols sont les principaux polyols de fermentation contenus dans les vins après le glycérol. Malgré une concentration plus faible, ils peuvent avoir un rôle complémentaire au glycérol dans l'amélioration de la structure et de la douceur.

### 1.3.3.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller
- Appareil CG-FID

### 1.3.3.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

#### 1.3.3.5. Procédure

Quantification de la teneur en 2,3-butanediols produits lors de microvinifications effectuées pures et utilisant une souche de levure précise en conditions isothermes à 25°C. Méthode d'analyse : méthode de détermination : chromatographie en phase gazeuse (CG) avec détection à ionisation de flamme (FID). Choisir des souches produisant des quantités proches ou supérieures à 1 $g \cdot l^{-1}$.

### 1.3.4. ADSORPTION D'ANTHOCYANINE PAR LES PAROIS CELLULAIRES

#### 1.3.4.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges, en particulier dans les régions où la chaleur climatique entraîne une faible synthèse d'anthocyanine.

#### 1.3.4.2. Principe

Les anthocyanines sont en grande partie adsorbées par les parois cellulaires de levure pendant la fermentation et la macération, en fonction de leur caractère polaire et de la structure moléculaire de la paroi. Les levures à faible taux d'adsorption d'anthocyanine peuvent être sélectionnées, afin de réduire au maximum la perte d'anthocyanines et les conséquences éventuelles sur la couleur du vin.

#### 1.3.4.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Centrifugeuse
- Appareil CLHP-DAD-MS
- Colonne C18 pour CLHP à phase inversée



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

#### 1.3.4.4. Réactifs et produits

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Raisin rouge pressé frais, ou milieux modèles avec extraits d'anthocyanine.
- Méthanol
- Acide formique
- Eau Milli-Q

#### 1.3.4.5. Procédure

Fermentation d'un moût de raisin rouge ou d'un milieu modèle enrichi d'un extrait d'anthocyanine. La biomasse de la levure utilisée pour fermenter ce volume de moût est récupérée par centrifugation. Extraction de l'anthocyanine contenu dans les parois cellulaires après fermentation lors de microvinifications standard effectuées avec une seule souche. Les différents types d'anthocyanines adsorbées par les parois cellulaires sont quantifiés et identifiés par CLHP-PDA. L'adsorption d'anthocyanine par les parois cellulaires de levure varie de 2 % à 6 % du total..

#### 1.3.4.6. Bibliographie

1. Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Suberviola, J.; Bartolomé, B.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 4084-4088.
2. Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. Eur. Food Res. Technol. 2005, 220, 341-346

### 1.3.5. PRODUCTION OPTIMALE D'ACÉTALDÉHYDE ET D'ACIDE PYRUVIQUE POUR FAVORISER LA PRODUCTION DE VITISINES

#### 1.3.5.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges, en particulier ceux destinés à un élevage prolongé dans le bois, grâce à la haute stabilité des dérivés



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

de pyranoanthocyanes.

### 1.3.5.2. Principe

Les vitisines sont des pigments à haute stabilité qui résistent à la décoloration par dioxyde de soufre, par réactions d'hydratation et d'oxydation. Ces pigments sont introuvables dans le raisin mais sont formés pendant la fermentation par condensation avec des métabolites de fermentation (acétaldéhyde et acide pyruvique). Les vitisines possèdent une structure propre aux pyranoanthocyanes. La caractérisation de levures produisant des taux d'acétaldéhyde et d'acide pyruvique appropriés permet d'augmenter la formation de ces pigments à haute stabilité pendant la fermentation.

### 1.3.5.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Appareil CLHP-DAD-MS.
- Colonne C18 pour CLHP à phase inversée

### 1.3.5.4. Réactifs et produits

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Raisin rouge pressé frais, ou milieux modèles avec extraits d'anthocyanine. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Méthanol
- Acide formique
- Eau Milli-Q



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 1.3.5.5. Procédure

Suivi des microvinifications effectuées sur un moût rouge inoculé avec une culture pré cultivée d'une souche de levure. Analyse des vitisines formées par CLHP/PDA et CLHP/ESI-MS. Pour une meilleure fiabilité, effectuer le test trois fois. Choisir des souches qui favorisent une formation importante de pyranoanthocyanes.

### 1.3.5.6. Bibliographie


1. Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with vitisin A and B formation in red wines. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 7402-7409.
2. Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Gómez-Cordovés, M. C.; Suárez, J. A. Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. Food. Chem**. 2007**, 100, 1144-1152.
3. Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Formación de vitisinas durante la fermentación de vinos tintos. Tecnología del vino, 2004, 21, 61-65.


## 1.3.6. SOUCHES À ACTIVITÉ DÉCARBOXYLASE D'HYDROXYCINNAMATE ET FORMATION DE PYRANOANTHOCYANES VINYLPHÉNOLIQUES

### 1.3.6.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges, en particulier ceux destinés à un élevage prolongé dans le bois, grâce à la haute stabilité des dérivés de pyranoanthocyanes.

### 1.3.6.2. Principe

Les dérivés vinylphénoliques d'anthocyanine sont des pigments de type pyranoanthocyane. Ils possèdent des propriétés semblables aux vitisines. Ces pigments sont introuvables dans le raisin mais sont formés pendant la fermentation par condensation avec des vinylphénols, qui sont libérés à partir d'acides hydroxycinnamiques du raisin. Ceux-ci sont produits par des souches *Saccharomyces* à activité décarboxylase d'hydroxycinnamate. Les levures à activité décarboxylase d'hydroxycinnamate permet d'augmenter la formation de ces pigments à haute



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

stabilité pendant la fermentation.

### 1.3.6.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Appareil CLHP-DAD-MS.
- Colonne C18 pour CLHP à phase inversée

### 1.3.6.4. Réactifs et produits

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Raisin rouge pressé frais, ou milieux modèles avec extraits d'anthocyanine. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Méthanol
- Acide formique
- Eau Milli-Q
- Acide p-coumarique, acide férulique et acide caféique.

### 1.3.6.5. Procédure

Suivi des microvinifications effectuées sur un moût rouge inoculé avec une culture pré cultivée d'une souche de levure. Analyse des additifs vinylphénoliques d'anthocyanine formés par CLHP/PDA et CLHP/ESI-MS. Pour une meilleure fiabilité, effectuer le test trois fois.

### 1.3.6.6. Bibliographie

1. Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Protección de



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

color y aroma en vinos tintos mediante la formación de derivados vinilfenólicos de antocianos. Tecnología del vino, 2005, 24,32-36

2. Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Calderón, F.; Suárez, J. A. Effects of pH, temperature and $SO_2$ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. Int. J. Food Microbiol. 2006, 106, 123-129.
3. Morata, A.; González, C.; Suárez, J. A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. Int. J. Food Microbiol. 2007, 116, 144-152.

## 1.3.7. ACTIVITÉ □-GLUCOSIDASE

### 1.3.7.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 1.3.7.2. Principe

Les anthocyanines existent dans le raisin sous forme de glycosides. Certaines souches à activité □-glucosidase extracellulaire permettent d'hydrolyser et de convertir les anthocyanines en aglycones, qui sont plus instables. Ceci peut influencer la stabilité de la couleur. Pour la production de vins rouges, choisir des souches □-glucosidase.

### 1.3.7.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire

### 1.3.7.4. Réactifs et produits

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Galerie API-ZYM pour la mesure des activités enzymatiques extracellulaires (bioMérieux SA, Lyon, France).



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

#### 1.3.7.5. Procédure

Détection de l'activité ▫-glucosidase exocellulaire in vitro. Utiliser des cultures pures synchronisées avec une population de 108 UFC $ml^{-1}$ de 24-48 heures. Vérification en conditions œnologiques de l'activité ▫-glucosidase. Méthode : Galeries enzymatiques utilisant le système API-ZYM (bioMérieux SA, Lyon, France). Choisir des souches de levure sans activité ▫-glucosidase.

#### 1.3.7.6. Bibliographie

1. Suárez-Lepe, J. A. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed Mundiprensa, Madrid**,** 1997, 110-111.
2. Delcroix, J.; Gunata, Z.; Sapis, J. C.; Salmon, J. M. ; Bayonave, C. Glucosidase Activities of Three Enological Yeast Strains During Winemaking: Effect on the Terpenol Content of Muscat Wine. Am. J. Enol. Vitic. 1994, 45, 291-296.

# 2. CARACTÉRISTIQUES AFFECTANT LA QUALITÉ ORGANOLEPTIQUE DU VIN

## 2.1. PRODUCTION D'ACIDITÉ VOLATILE

### 2.1.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification

### 2.1.2. Principe

L'acidité volatile est exprimée en g/l d'acide acétique. L'acide acétique est un acide de fermentation à profil organoleptique négatif lorsque présent en concentrations élevées, témoin de modifications microbiologiques. La plupart des réglementations des régions vinicoles établissent des quantités limites d'acidité volatile dans les vins finis.

Afin d'accentuer le processus de macération dans la vinification des vins rouges, les températures de fermentation utilisées sont souvent supérieures à celles des vins blancs (25-32°C). La production d'acidité volatile est proportionnelle à la température de fermentation. Les levures capables de fermenter dans cette plage de températures et avec un faible taux d'acidité volatile permettent d'améliorer la qualité



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

organoleptique des vins rouges.

### 2.1.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller
- Equipement de distillation par entraînement à la vapeur et matériel de titration (neutralisation)

### 2.1.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Réactifs nécessaires à la détermination de l'acide acétique [1]

### 2.1.5. Procédure

Quantification de l'acidité volatile produite lors de microvinifications effectuées avec une souche pure de levure en conditions isothermes et à une température déterminée (30-32 °C). Les valeurs de température sont choisies en fonction de vinification des vins blancs ou rouges. . La concentration de levure au moment de l'inoculation dans le milieu donné devrait être approximativement de $10^6$ cellules vivante / $ml^{-1}$

Méthode d'analyse : méthode de référence OIV, distillation par entraînement à la vapeur et titrage acide-base [1]. Une alternative consiste à utiliser la méthode enzymatique pour la détermination de la quantité d'acide acétique produite par les levures sélectionnables. L'acide acétique peut également être déterminé par chromatographie liquide (CLHP) à détection UV.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Pour une meilleure fiabilité statistique, la détermination de l'acidité volatile dans les échantillons fermentés par les levures sélectionnables doit être effectuée trois fois. Il est recommandé d'étudier la variation de la production d'acidité volatile en fonction de la température, selon le type de processus de production.

### 2.1.6. Bibliographie

1. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV. MA-F-AS313-02-ACIVOL. 2006
2. Calderón, F.; Gutierrez-Granda, M. J., Suárez-Lepe, J. A. Isolation, identification and physiological characterization of indigenous yeast of Chardonnay grapes from Somontano. Am. J. Enol. Vitic. 1994, 45, 368.

## 2.2. PRODUCTION DE GLYCÉROL

### 2.2.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 2.2.2. Principe

Le glycérol est le principal polyol contenu dans les vins après l'eau et l'éthanol. De par sa structure, le glycérol joue un rôle important, car il permet d'augmenter la densité et la douceur des vins. La quantité de glycérol produite dépend de la teneur initiale en sucre, des conditions de fermentation, et de la souche de levure utilisée.

L'utilisation de souches surproductrices de glycérol joue un double rôle dans l'amélioration de la structure des vins rouges. D'une part, elle permet d'augmenter la structure et la densité en bouche, et de l'autre, de faciliter l'intégration des tannins en atténuant leur passage en bouche et en mitigeant l'excès d'astringence.

### 2.2.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Spectrophotomètre UV-visible
- Cuves

### 2.2.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Test enzymatique pour la détermination du glycérol

### 2.2.5. Procédure

Détermination du glycérol dans des microvinifications de 50 ml fermentées en conditions isothermes à 25°C et avec un inoculum de levure synchronisé. Analyse du contenu final après fermentation pour la détermination du glycérol dans les aliments. Le glycérol peut également être déterminé par chromatographie liquide (CLHP) à détection IR. Il est recommandé d'effectuer le test trois fois et de comparer les résultats à l'aide d'une souche témoin à forte productivité.

Les souches *Saccharomyces* produisent normalement entre 5 et 8 $g \cdot l^{-1}$ de glycérol.

### 2.2.6. Bibliographie

1. Eggstein, M.; Kuhlmann, E. In Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer, H. U., Ed.; 3er ed.; Academic Press, Inc.: New York, 1974; Vol IV, pp 1825-1831
2. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV. MA-F-AS312-05-GLYENZ. 2006
3. Walter, E.; Kohler, P. Ringversuch für dieenzymatische bestimmung von glycerin. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1985, 180, 121-125.

## 2.3. PRODUCTION D'ALCOOLS SUPÉRIEURS



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 2.3.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 2.3.2. Principe

Les alcools supérieurs principaux trouvables dans le vin sont : le *n*-propanol, l'isobutanol, l'alcool amylique actif, l'alcool isoamylique, le 2-phényléthanol. Ces alcools proviennent du métabolisme glycolytique des sucres ou du métabolisme de l'acide aminé correspondant (thréonine, valine, isoleucine, phénylalanine). Ils apportent aux vins leur arôme alcoolique de fermentation. En faible quantité, ces composés ont un effet positif sur l'arôme du vin, tandis que les fortes concentrations (> 350 $mg \cdot l^{-1}$) nuisent au bouquet du vin, l'alcool isoamylique en particulier.

Dans le cas de la production de jeunes vins blancs à partir de variétés aromatiques, choisir un levain à faible teneur en alcools supérieurs.

Dans le cas de la production de jeunes vins blancs à partir de cultivars neutres, il est nécessaire de réduire au minimum la production d'alcools supérieurs (< 400 $mg \cdot l^{-1}$).

Dans les vins rouges de haute qualité, la teneur en alcools supérieurs doit être réduite en sélectionnant des levures à faible production (inférieure à 300 $mg \cdot l^{-1}$), afin d'éviter que les arômes de fermentation n'occultent les arômes variétaux ou ceux obtenus pendant l'élevage dans le bois.

### 2.3.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller
- Appareil CG-FID

### 2.3.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

### 2.3.5. Procédure

Quantification de la teneur en alcools supérieurs produits lors de microvinifications effectuées pures et utilisant une souche de levure précise en conditions isothermes à 25°C. Méthode d'analyse : méthode de détermination : chromatographie en phase gazeuse (CG) avec détection à ionisation de flamme (FID).

## 2.4. PRODUCTION de l'acétaldÉhyde

### 2.4.1. Domaine d'application

Critère standard pour les levures de vinification.

### 2.4.2. Principe

L'acétaldéhyde est un produit de la fermentation alcoolique qui représente 90 % des aldéhydes totaux du vin. En général, la présence de teneurs élevées en acétaldéhyde dans le vin est préjudiciable, en raison de l'odeur amère et du goût d'éventé et d'herbacé quand la concentration atteint 100-125 $mg \cdot l^{-1}$.

### 2.4.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller
- Appareil CG-FID

### 2.4.4. Réactifs et produits



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

### 2.4.5. Procédure

Surveiller la production d'esters dans les microvinifications en conditions isothermes à 25°C avec un inoculum de levure synchronisé. Méthode d'analyse : CG-FID.

## 2.5. PRODUCTION D'ESTERS

### 2.5.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 2.5.2. Principe

Les esters sont produits par les levures pendant la fermentation alcoolique ; ces composés apparaissent par condensation de l'acides acétique et des acides gras en présence d'éthanol ou d'autres alcools présents dans le vin. Le principal ester présent dans le vin est l'acétate d'éthyle, qui contribue principalement à l'arôme du vin en lui conférant une odeur de vinaigre typique. Il est souhaitable que les concentrations se situent entre 50 et 80 $mg \cdot l^{-1}$ pour l'arôme du vin, car de fortes concentrations produisent un résultat désagréable.

Afin d'améliorer le profil olfactif de variétés à arôme neutre, les levures choisies généralement utilisées sont celles produisant des esters pendant la fermentation, augmentant ainsi les arômes secondaires responsables du caractère fruité (acétate isoamylique, acétate isobutylique, etc.) du vin.

Afin d'améliorer le profil olfactif de variétés à l'arôme riche en terpènes, les levures utilisées sont celles produisant des composés volatiles minimum pendant la fermentation. En général, les composés volatiles produits pendant la fermentation occultent ou réduisent certains arômes variétaux qui sont indispensables d'un point de vue olfactif.

Les souches de levure appropriées pour la vinification doivent produire différentes quantités d'ester en fonction de la technique de vinification utilisée.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 2.5.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller
- Appareil CG-FID

### 2.5.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

### 2.5.5. Procédure

Surveiller la production d'esters dans les microvinifications en conditions isothermes à 25°C avec un inoculum de levure. Méthode d'analyse : CG–FID.

### 2.5.6. Bibliographie

1. Calderón, F.; Gutiérrez-Granda, M. J., Suárez-Lepe, J. A. Isolation, identification and physiological characterization of indigenous yeast of Chardonnay grapes from Somontano. Am. J. Enol. Vitic. 1994, 45, 368.
2. Morata, A.; Calderón, F.; Colomo, B.; González, M. C., Uthurry, C.; Varela, F.; Yeramian, N.; Suárez, J. A. Primeros criterios de selección de levaduras para la vinificación en tinto. Semana Vitivinícola. 2005, 3057, 806-809.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

## 2.6. PRODUCTION DE COMPOSÉS SULFURIQUES VOLATILES (SULFURE D'HYDROGÈNE ET MERCAPTANS)

### 2.6.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation standard pour les levures de vinification. Certaines variétés de raisin favorisent la production d'arômes de réduction.

### 2.6.2. Principe

Lors de la caractérisation des levures de vinification, des souches capables de fermenter avec une production de quantités minimum de $H_2S$ et d'autres composés sulfuriques comme les mercaptans sont préférables. Ceci s'applique notamment à la vinification des vins rouges.

### 2.6.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire et pour l'analyse
- Bouchons Capoteck
- Plaques de Petri stériles

### 2.6.4. Réactifs et produits

#### 2.6.4.1.

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1). Le pH est ajusté à 3,5 avec de l'acide tartrique.
- Solution saturée d'acétate de plomb.
- Papier sulfite de 10 cm x 1 cm.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

2.6.4.2.

- Agar BiGGY, milieu synthétique
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées en milieu YEPD

### 2.6.5. Procédure

2.6.5.1.

Inoculer des éprouvettes contenant 5 ml de milieu de fermentation stérilisé avec 100 µl d'inoculum. Placer une bande de papier sulfite imbibée d'acétate de plomb à l'ouverture de l'éprouvette. Effectuer une quantification comparative du $H_2S$ libéré dans des microvinifications réalisées pures avec une souche précise. Méthode d'analyse semi-quantitative. Le $H_2S$ produit réagit avec l'acétate de plomb en produisant du sulfure de plomb de couleur noire. La quantité de sulfure de plomb formée est proportionnelle à la quantité de $H_2S$ libéré et se reconnaît par une tache de couleur noire, grande en taille et en intensité.

2.6.5.2.

Les souches de levure sont inoculées (108 cellules/ml) sur un milieu d'agar BiGGY et les plaques sont incubées 24h à 26°C. Les souches de levure développent des colonies de couleur variant du blanc-crème au marron-noir en fonction des quantités croissantes de sulfure d'hydrogène produit.

### 2.6.6. Bibliographie

1. Morata, A.; Calderón, F.; Colomo, B.; González, M. C., Uthurry, C.; Varela, F.; Yeramian, N.; Suárez, J. A. Primeros criterios de selección de levaduras para la vinificación en tinto. Semana Vitivinícola. 2005, 3057, 806-809.

## 2.7. ACTIVITÉ SUR L'ACIDE MALIQUE

Les souches de levure sont capables de dégrader ou de produire de l'acide malique. Dans les régions tempérées, avec des moûts de raisins caractérisés par une forte acidité et de faibles valeurs pH, les souches possédant une forte capacité de dégradation de l'acide malique sont préférables. Dans le cas contraire, en présence de moûts de raisins caractérisés par une faible acidité et des valeurs pH élevées, les vins



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

caractérisés par une acidité suffisante sont préférables, ainsi les souches de levure produisant de l'acide malique doivent être préférées.

### 2.7.1. Domaine d'application

Production de vins blancs avec des raisins provenant de régions où la quantité de chaleur nécessaire à la maturation est insuffisante.

Production de vins blancs avec des raisins provenant de régions chaudes, à faible taux d'acidité.

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 2.7.2. Principe

La plupart des souches *Saccharomyces cerevisiae* peuvent dégrader l'acide malique, mais seules certaines sont capables de le faire en grande quantité, et donc de permettre son élimination. Ceci peut avoir un intérêt tout particulier pour la réduction de l'acidité dans les vins produits dans les régions où la maturation est faible.

Certaines souches S*accharomyces cerevisiae* produisent de l'acide malique comme produit de la fermentation alcoolique. Dans les moûts produits dans les régions chaudes, les niveaux de pH peuvent être réduits et l'acidité être améliorée en utilisant des levures capables de produire de grandes quantités d'acide malique.

L'utilisation de souches à dégradation d'acide malique favorise la fermentation malolactique, qui est réalisée grâce aux bactéries.

### 2.7.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller
- Spectrophotomètre UV visible
- Cuves



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 2.7.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Test enzymatique pour la détermination de l'acide malique

### 2.7.5. Procédure

Détermination de l'acide malique dans des microvinifications de 50 ml fermentées en conditions isothermes à 25°C. Analyse du contenu final après fermentation pour la détermination de l'acide malique dans les aliments. Pour une meilleure fiabilité, il est recommandé d'effectuer le test trois fois.

### 2.7.6. Bibliographie

1. Calderón, F.; Gutiérrez-Granda, M. J., Suárez-Lepe, J. A. Isolation, identification and physiological characterization of indigenous yeast of Chardonnay grapes from Somontano. Am. J. Enol. Vitic. 1994, 45, 368.
2. Suárez-Lepe, J. A. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed Mundiprensa, Madrid, 1997, 153-156
3. Mayer, H.; Pause, G. Äpfelsaure-, milchsäure-, und zitronensäure gehalte in Schweizer weinen. Vitis, 1969, 8, 38-49.
4. Klopper, W. J.; Angelino, S. A.; Tuning, B.; Vermeire, H. A. Organic acids and glycerol in beer. J. Inst. Brew., 1986, 92, 225-228
5. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV. MA-F-AS313-11-ALMENZ. 2006
6. Morata, A.; Calderón, F.; Colomo, B.; González, M. C., Uthurry, C.; Varela, F.; Yeramian, N.; Suárez, J. APrimeros criterios de selección de levaduras para la vinificación en tinto. Semana Vitivinícola. 2005, 3057, 806-809.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

## 2.8. ACTIVITÉ □-GLUCOSIDASE POUR AUGMENTER LA LIBÉRATION DES TERPÈNES

### 2.8.1. Domaine d'application

Production de jeunes vins blancs à partir de variétés aromatiques.

### 2.8.2. Principe

Les arômes à base de terpène présents dans la plupart des variétés aromatiques, existent en général sous forme de glycosides, ce qui réduit leur volatilité. Il existe certaines souches *Saccharomyces cerevisiae* à activités □-glucosidase et □-xylosidase qui permettent d'optimiser la libération de terpène.

### 2.8.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire

### 2.8.4. Réactifs et produits

- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.
- Galerie API-ZYM pour la mesure des activités enzymatiques extracellulaires (bioMérieux SA, Lyon, France).
- **Détermination qualitative :**
    - Milieu gélosé YNB (base azotée de levure) gélosé contenant du xylose comme source de carbone, ajouté à une solution spécifique, telle que le MUX (4-méthyl-umbelliféryl-□-D-xyloside), pour l'activité □-D-xilosidase. Milieu contenant de l'arbutine comme source de carbone, ajouté au citrate d'ammonium de fer, pour l'activité □-D-glucosidase.
- **Détermination quantitative :**



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- L'activité □-glucosidase a été déterminée dans un milieu contenant 1,7 $g \cdot l^{-1}$ de YNB (Difco) (sans acides aminés ni sulfate d'ammonium), 5 g $l^{-1}$ de sulfate d'ammonium, 5 $g \cdot l^{-1}$ d'extrait de levure, 5 $g \cdot l^{-1}$ de peptone, 10 $g \cdot l^{-1}$ de glucose, pH 5,5. Pour la détermination de l'activité □-xylosidase, le même milieu a été utilisé en remplaçant le glucose par du xylose. L'activité □-glucosidase a été mesurée en utilisant du ρ-nitrophényl-□-D-glucosidase (ρ-NPG) ; l'activité □-xylosidase a été mesurée en utilisant du ρ-nitrophényl-□-D-xylosidase (□-NPX) comme substrat. Avant l'inoculation, les levures sont cultivées pendant la nuit en milieu GPY (glucose 40 $g \cdot l^{-1}$ ; peptone 5 $g \cdot l^{-1}$ ; extrait de levure 5 $g \cdot l^{-1}$ ; pH 5,5) à 25°C dans un agitateur orbital à 200 t/mn.

### 2.8.5. Procédure

Détection de l'activité □-glucosidase exocellulaire in vitro. Utiliser des cultures pures avec une population de 108 $UFC \cdot ml^{-1}$ de 24-48 heures. Vérification en conditions œnologiques de l'activité □-glucosidase. Méthode : Galeries enzymatiques utilisant le système API-ZYM

#### 2.8.5.1. Détermination qualitative

Les cellules neuves des souches de levure sont inoculées sur les plaques, qui sont incubées à 26°C pendant 24 h (pour l'activité □-D-xylosidase) ou pendant 2-4 jours, dans le cas de l'activité □-D-glucosidase.

L'activité □-D-xylosidase est déterminée par fluorescence UV. Les colonies de souche présentant une fluorescence sont considérées positives pour cette procédure : d'ailleurs, l'enzyme □-D-xylosidase détermine l'hydrolyse du MUX en libérant du MU (4-méthyl-umbelliféryl), visualisé par exposition UV.

Les souches de levure considérées positives pour l'activité □-D-glucosidase présentent des colonies de couleur marron en milieu contenant de l'arbutine comme source de carbone.

#### 2.8.5.2. Détermination quantitative

Après pré-culture en milieu GPY, les souches de levure sont cultivées dans le milieu précédemment indiqué à 26°C pendant 3 jours dans un agitateur orbital à 200 t/mn. La phase supérieure, récoltée par centrifugation, a été ajoutée à 0,2 ml de □NPG ou de



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

□NPX ; après 1h d'incubation à 30°C, l'absorbance a été mesurée à 404 nm afin de déterminer la quantité de □-nitrophényl libérée par l'activité enzymatique. Les activités □-D-glucosidase et □-D-xylosidase sont exprimées en µmol de □NP/h/ml de la phase supérieure.

### 2.8.6. Bibliographie


1. Suárez-Lepe, J. A. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed Mundiprensa, Madrid, 1997, 110-111.
2. Delcroix, J.; Gunata, Z.; Sapis, J. C.; Salmon, J. M. ; Bayonave, C. Glucosidase Activities of Three Enological Yeast Strains During Winemaking: Effect on the Terpenol Content of Muscat Wine. Am. J. Enol. Vitic. 1994, 45, 291-296
3. Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. (Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of □-D-xylosidase activity. Int. J. Food Microbiol. 1999, 46, 105-112.
4. Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., Vallés, S. A preliminary search for anthocyanin-β-D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. Int. J. Food Sci. Technol. 2000, 35, 95-103.


# 3. CRITÈRES AFFECTANT LA QUALITÉ DU VIN EN MATIÈRE DE SANTÉ

## 3.1. PRODUCTION ÉTHYLIQUE DE CARBAMATE PAR DES SOUCHES D'ARGINASE NÉGATIVE

### 3.1.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 3.1.2. Principe

Le carbamate d'éthyle (uréthane) est une molécule toxique, décrite comme un agent cancérigène, et sa formation est fonction de l'activité microbienne dans les vins (bactéries et levures) à certaines valeurs pH et à certaines concentrations de précurseurs azotés. La caractérisation de levures qui, après fermentation alcoolique, produisent des vins avec une faible formation de carbamate d'éthyle, est un moyen efficace de contrôler les teneurs de cette molécule controversée dans les vins. Il est



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

important de rappeler que certains pays ont fixé des limites de concentration de carbamate d'éthyle pour l'importation de vins.

### 3.1.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer
- Appareil CG-MS
- Colonne capillaire
- Appareil d'extraction sur colonne
- Évaporateur rotatif

### 3.1.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Dichlorométhane

### 3.1.5. Procédure

Concentration et extraction du carbamate d'éthyle à partir de 50 ml d'échantillon fermenté (produit dans des microvinifications effectuées pures à l'aide d'une souche sélectionnée), puis détermination du carbamate d'éthyle par GC-MS à l'aide du spectromètre de masses en mode SIM.

### 3.1.6. Bibliographie

1. Uthurry, C.A.; Varela, F.; Colomo, B.; Suárez Lepe, J. A.; Lombardero, J.; García del Hierro, J. R. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wine. Food



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Chemistry, 2004, 88, 329-336

2. Uthurry, C.A.; Suárez Lepe, J. A.; Lombardero, J.; García del Hierro, J. R. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine, Food Chemistry, 2006, 94, 262-270.

## 3.2. PRODUCTION D'HISTAMINE À pH ÉLEVÉ

### 3.2.1. Domaine d'application

Critère de caractérisation de souches pour la production de vins rouges.

### 3.2.2. Principe

Les amines biogéniques, telles que l'éthanolamine, le phényléthylamine, la méthylamine, l'agmatine, l'histamine, la putrescine, la cadavérine et la tyramine, sont des bases organiques à faible poids moléculaire qui peuvent se trouver dans le vin, dans lequel elles sont principalement produites par décarboxylation microbienne des acides aminés. Ces composés nuisent à la comestibilité du vin.

Les amines biogéniques sont des molécules provenant du métabolisme de l'azote. Elles peuvent produire un effet toxique en fonction de la concentration et de la sensibilité individuelle. Elles posent un véritable problème aux personnes sensibles à l'histamine. De façon plus générale, elles provoquent des maux de tête et d'autres effets indésirables. En outre, l'éthanol présent dans le vin renforce les effets toxiques des amines biogéniques. Les levures contribuent à la production d'éthanolamine, d'agmatine et de phényléthylamine, tandis que les levures de vinification sont de faibles producteurs d'histamine, qui est l'amine caractérisée par le plus fort taux de toxicité.

Quoi qu'il en soit, la capacité de production d'amines biogéniques devrait être rajoutée aux critères de caractérisation des levures de vinification.

Comme pour le carbamate d'éthyle, il existe des limites de concentration d'amine biogénique, et en particulier d'histamine, pour le commerce de vins.

### 3.2.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer
- Appareil CLHP FDA
- Colonne C18

### 3.2.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).

### 3.2.5. Procédure

Détermination de la quantité d'histamine produite par une levure choisie dans des microvinifications. La détection et la quantification sont effectuées par CLHP FDA après dérivatisation avec du chlorure de dansyl ou *o*-phthaldéhyde (OPA).

### 3.2.6. Bibliographie

1. Galgano F., Caruso M.,Favati F., Romano P. HPLC determination of agmatine and other amines in wine. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2003, 74, 237-242
2. Caruso M., Fiore C., Contorsi M., Salzano G., Paparella A., Romano P. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. World Journal Microbiol. Biotechnol., 2002**,** 18, 159-163.
3. Granchi L., Romano P., Mangani S., Guerrini S., Vicenzini M. Production of biogenic amines by wine microorganisms, Bulletin dell'OIV, 2005, 78, 595-609.

## 3.3. ACTIVITE DES LEVURES SUR L'OCHRATOXINE A (OTA)

### 3.3.1. Domaine d'application

Critère standard pour la caractérisation des levures de vinification.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

### 3.3.2. Principe

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine trouvée dans le vin en raison de l'activité métabolique des moisissures présentes sur les raisins. Étant donné que l'OTA a présenté des propriétés néphrotoxiques, hépatotoxiques et tératogéniques pour les humains et les animaux, il a été classé comme agent potentiellement cancérigène pour les humains (Centre International de Recherche sur le Cancer, groupe 2B, 1993). L'Europe a récemment fixé le niveau résiduel maximum d'OTA dans les vins à 2 µg/l. Certaines levures se sont avérées capables de réduire la teneur en OTA du vin ; en conséquence, choisir les souches possédant cette caractéristique.

### 3.3.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer avec valve Müller
- Balance analytique, précision à 0,1 g
- Appareil CLHP

### 3.3.4. Réactifs et produits

Milieu de fermentation synthétique (6,7 % YNB), 20 % glucose et 0,1 % de phosphate de diammonium, ajusté à pH 3,6 avec de l'acide tartrique).

### 3.3.5. Procédure

Des précultures de levures ont été préparées dans 50 ml de milieu de fermentation synthétique sur un agitateur rotatif à 250 t/mn pendant 24h à 25°C.

La suspension inoculée avec une concentration de 1 x $10^6$ cellules/ml est inoculée dans des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller, contenant le milieu de fermentation synthétique auquel l'on ajoute 10 µg/l d'OTA. Les échantillons ont été incubés sans agitation à 26°C. La perte de poids est surveillée quotidiennement jusqu'au jour où plus aucune variation n'est observée.

Une aliquote de 5 ml des milieux de culture inoculés avec différentes souches est



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

transférée dans une éprouvette en verre et centrifugée à 4000 t/mn pendant 5 minutes. Un ml de la couche aqueuse, précédemment séparée des levures, est transféré dans un flacon puis injecté pour l'analyse CLHP. La phase solide (levures) est extraite à l'aide de 5 ml d'acétate d'éthyle dans un agitateur-mélangeur à vortex pendant 30s. Les extraits sont réunis, et 2 ml de la solution obtenue sont doucement évaporés à sec avec de l'azote. Le résidu est dissous dans 1 ml d'eau bidistillée et injecté pour l'analyse CLHP.

Utiliser un chromatographe liquide LaChrom-Merck-Hitachi (Hitachi Ltd, Tokyo, Japon) composé d'une interface D-7000, d'une pompe L-7100, d'un échantillonneur automatique L-7200 et d'un détecteur de fluorescence L-7485. Utiliser une colonne Spherisorb ODS2 (4,6 mm x 250 mm ; 5 µm ; Waters, Milan, Italie). Le volume d'injection est de 50 µL, et le débit était de 1 ml/min. L'élution d'OTA s'effectue avec une solution tampon d'ammonium (a) et d'acétonitrile (b) en tant que mélange d'élution, et à l'aide du programme suivant : t=0 A 90 % isocratique pendant 15 minutes, t=30 A 75 % avec le gradient. Dans ces conditions chromatographiques, le temps de rétention de l'OTA est d'environ 28 minutes.

Le détecteur de fluorescence est respectivement réglé à 333 et 440 nm pour l'excitation et pour les longueurs d'onde d'émission. Des déterminations quantitatives sont effectuées d'après la méthode standard externe en mesurant la surface de pic par rapport aux concentrations. Les graphiques de calibrage sont produits en injectant des solutions étalons préparées dans de l'eau bidistillée, avec cinq taux de concentration. La limite de détection (LOD) calculée est de 0,1 µg/l, et la limite de quantification (LOQ) est de 0,2 µg/l.

### 3.3.6. Bibliographie

1. Angioni A., Caboni, P. Garau A., Farris G.A., Orro D., Budroni M., Cabras P. "In vitro interaction between OTA and different souches of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*" *J Agric Food Chem*. 2007, 7, 55(5), 2043-2048.

## 3.4. PRODUCTION DE MÉTHANOL

### 3.4.1. Domaine d'application

Critère standard pour la caractérisation des levures de vinification.

### 3.4.2. Principe

Le méthanol ($CH_3OH$) est l'alcool le plus simple. Il provient de la dégradation de la



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

paroi cellulaire par l'activité enzymatique pendant la vinification. La caractérisation de levures déterminant moins de 150 mg/l de méthanol est encouragée.

### 3.4.3. Appareillage

- Stérilisateur
- Chambre à flux laminaire
- Pipettes à embouts stériles
- Éprouvettes pour la synchronisation cellulaire
- Fioles d'Erlenmeyer de 100 ml avec valve Müller
- Appareil CG-FID

### 3.4.4. Réactifs et produits

- Milieu de fermentation préparé par la dilution d'un moût de raisins concentré jusqu'à ce que la concentration en sucre atteigne 212 $g \cdot l^{-1}$. Des milieux synthétiques de composition semblable peuvent être utilisés à la place (Annexe 1).
- Avant l'inoculation, les cultures de levure sont cultivées pendant 24h en milieu YEPD.

### 3.4.5. Procédure

La mesure du méthanol pendant des microvinifications effectuées en utilisant une seule souche de levure en conditions isothermes à 25°C. Méthode d'analyse : méthode de référence OIV, chromatographie en phase gazeuse avec détection à ionisation de flamme (CG-FID).

### 3.4.6. Bibliographie

1. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV. MA-F-AS312-03-METHAN. 2006.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

# ANNEXE 1

## Milieux synthétiques à composition semblable à celle du moût de raisin.

1- Le milieu 1 présenté dans le tableau 1 est le milieu de jus de raisin défini chimiquement décrit par Henschke et Jiranek (1993), mais contenant une quantité plus faible d'acides aminés afin de donner une concentration d'azote de 200 $mg.l^{-1}$, une plus forte teneur en sucres (230 $g.l^{-1}$ au lieu de 200 $g.l^{-1}$) et un cinquième de la quantité de vitamines. Le milieu est stérilisé par filtration.

Tableau 1 Composition du milieu synthétique 1

| | Composé | Quantité par litre |
|---|---|---|
| **Sources de carbone** | Glucose | 115 g |
| | Fructose | 115 g |
| **Acides organiques** | Tartrate de potassium | 5,00 g |
| | Acide citrique | 0,20 g |
| | Acide L-malique | 3,00 g |
| **Sels** | $K_2HPO_4$ | 1,14 g |
| | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1,23 g |
| | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,44 g |
| | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 198,2 µg |
| | $ZnCl_2$ | 135,5 µg |
| | $CuCl_2$ | 13,6 µg |



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

| | | |
|---|---|---|
| | $FeCl_2$ | 32,0 µg |
| | $H_3BO_3$ | 5,7 µg |
| | $Co(NO)_3 \cdot 6H_2O$ | 29,1 µg |
| | $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ | 24,2 µg |
| | $KIO_3$ | 10,8 µg |
| **Vitamines** | Myo-inositol | 20 mg |
| | Chlorhydrate de pyridoxine | 0,40 mg |
| | Acide nicotinique | 0,40 mg |
| | Pantothénate de calcium | 0,20 mg |
| | Hydrochlorate de Thiamine | 0,10 mg |
| | Acide p-Aminobenzoïque | 0,04 mg |
| | Riboflavine | 0,04 mg |
| | Biotine | 0,03 mg |
| | Acide folique | 0,04 mg |
| **Acides aminés** | Acide aspartique | 89 mg |
| | Acide glutamique | 126 mg |
| | Alanine | 26 mg |
| | Arginine | 188 mg |



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

| | | |
|---|---|---|
| | Asparagine | 39 mg |
| | Phénylalanine | 39 mg |
| | Glycine | 14 mg |
| | Glutamine | 51 mg |
| | Isoleucine | 51 mg |
| | Histidine | 39 mg |
| | Leucine | 76 mg |
| | Lysine | 63 mg |
| | Méthionine | 39 mg |
| | Proline | 126 mg |
| | Serine | 101 mg |
| | Tyrosine | 6.00 mg |
| | Thréonine | 89 mg |
| | Tryptophane | 26 mg |
| | Valine | 51 mg |
| **Sources d'azote** | $(NH_4)_2HPO_4$ | 100 mg |
| **Lipides** | Ergostérol | 10 mg |
| | Tween 80® | 0,5 ml |
| **pH** | | entre 3,2 et 3,5 |



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

*Tableau 2 Composition du milieu synthétique 2*

| **Composés** | | **Quantité par litre** |
|---|---|---|
| **Carbone** | D-glucose | 133 g |
| | D-fructose | 67 g |
| | Myo-inositol | 0,5 g |
| **Acides** | Tartrate KH | 2,5 g |
| | Acide L-malique | 3 g |
| | Acide citrique | 0,2 g |
| **Sels** | $K_2HPO_4$ | 1,14 g |
| | $MgSO_4.7H_20$ | 1,23 g |
| | $CaCl_2.2H_2O$ | 0,44 g |



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

| | | |
|---|---|---|
| **Azote** | $(NH_4)_2HPO_4$ | 300 mg |
| | L-alanine | 70 mg |
| | L-arginine | 525 mg |
| | L-asparagine | 105 mg |
| | Acide L-aspartique | 245 mg |
| | L-cystéine* | 7 mg |
| | L-glutamine | 140 mg |
| | Glycine | 35 mg |
| | L-histidine. $HCl.H_2O$ | 105 mg |
| | L-isoleucine | 140 mg |
| | L-leucine | 210 mg |
| | L-lysine. HCl | 175 mg |
| | L-méthionine | 105 mg |
| | L-phénylalanine | 105 mg |
| | L-proline | 350 mg |
| | L-serine | 280 mg |
| | L-thréonine | 245 mg |
| | L-tryptophane | 70 mg |
| | L-tyrosine | 14 mg |
| | L-valine | 140 mg |
| | Acide glutamique | 350 mg |



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

| | | |
|---|---|---|
| **Oligo-éléments** | $FeSO_4.7H_2O$ | 20 mg |
| | $MnSO_4.H_2O$ | 7,56 mg |
| | $ZnCl_2$ | 135 µg |
| | $CuCl_2.2H_2O$ | 15 µg |
| | $H_3BO_3$ | 5 µg |
| | $Co(NO_3)_2.6H_2O$ | 30 µg |
| | $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 25 µg |
| | $KIO_3$ | 10 µg |
| **Vitamines** | Pyridoxine.HCl | 2 mg |
| | Acide Nicotinique | 4,5 mg |
| | Pantothénate de calcium | 5 mg |
| | Thiamine. HCl | 0,5 mg |
| | PABA.K | 0,2 mg |
| | Biotine | 0,125 mg |
| **pH** | | 3,5 |

# Bibliographie


1. Henschke P. and Jiranek V. Yeasts- Metabolism of nitrogen compounds. In: Wine Microbiology and Biotechnology, Ed. Fleet G.H. 1993 Harwood Academic Publishers GmbH, Switzerland, Chur, pp. 77-164
2. Barrajón N., Capece A., Arévalo-Villena M., Briones A., Romano P. (2011) Co-inoculation of different Saccharomyces cerevisiae strains and influence on volatile




Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

composition of wines. Food Microbiology, 28: 1080-1086.

3. Costello P.J., Henschke P.A., Markides A.J. (2003) Standardised methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility. Australian Journal of Grape and Wine Research 9: 127-137.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012