

# L'oxygène au cours de la fermentation alcoolique : mécanismes d'action, gestions des apports et risques associés.

■ Monsieur Jean-Michel SALMON

INRA, Unité Mixte de Recherches 1083 "Sciences pour l'œnologie"

2, place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

jmsalmon@supagro.inra.fr

## Introduction

Autant le rôle de l'oxygène en fermentation est bien connu depuis les travaux de Pasteur, autant l'influence, bénéfique ou non, d'ajout(s) d'oxygène en fermentation reste encore sujette à caution du fait de la réactivité possible de cet oxygène avec des composés du milieu, ou simplement par le risque de voir se développer des micro-organismes indésirables dans le moût.

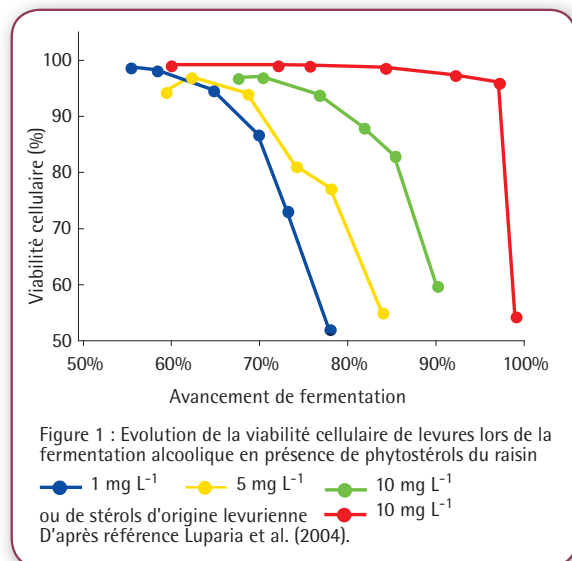
C'est à ces interrogations que nous souhaitons partiellement répondre dans cet exposé à partir de la littérature scientifique et d'expériences menées notamment à l'INRA.

## 1 Rôle de l'oxygène en fermentation alcoolique

En conditions d'anaérobiose, la croissance levurienne requiert de l'oxygène moléculaire pour sa propre synthèse de lipides (stérols et acides gras insaturés (1, 2), qui sont des composés essentiels pour le maintien de l'intégrité cellulaire, et donc de la viabilité.

En conditions œnologiques, des travaux récents ont montré que l'oxygène était en fait essentiellement utilisé pour la synthèse de stérols, et peu pour celles des acides gras insaturés (15).

En anaérobiose, la levure peut utiliser directement les phytostérols présents dans le moût de raisin (provenant essentiellement des cuticules et pellicules de la baie (8) en tant que substituts de stérols, pour démarrer sa croissance et initier la fermentation. Toutefois, en absence d'oxygène, cette incorporation de phytostérols finit par perturber les propriétés membranaires de la levure, et entraîne rapidement une forte chute de la viabilité cellulaire (11) (figure 1).



Dans de telles conditions (anaérobiose), la levure *Saccharomyces cerevisiae* nécessite l'apport de 5 à 7,5 mg L<sup>-1</sup> d'oxygène pour permettre une croissance optimale et une viabilité forte tout au long de la fermentation (17, 15).

## 2 Importance du contrôle de l'oxygénation

En conditions œnologiques, la levure en fermentation possède une très forte capacité à utiliser l'oxygène, lorsqu'on lui en fournit, mais en n'en dirigeant seulement 30 % à 75 % vers la synthèse de stérols, suivant le moment de l'ajout (19, 14, 15). Cet écart explique en fait pourquoi il est primordial, dans de telles conditions, d'apporter la quantité nécessaire et suffisante d'oxygène pour la synthèse des besoins en stérols des levures.

D'un point de vue technologique, lorsque l'ajout d'oxygène est effectué au bon moment (début de phase stationnaire, cf. infra), la vitesse spécifique de fermentation est augmentée sans augmentation de la biomasse cellulaire, traduisant bien la synthèse *de novo* de stérols (15) (figure 2).

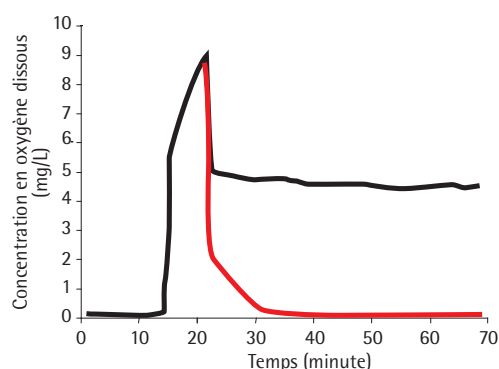


Figure 2 : Evolution de la concentration en oxygène dissous lors d'un ajout ponctuel d'oxygène (5 mg L<sup>-1</sup>) dans un moût de raisin à 20°C en phase stationnaire de croissance (à mi-fermentation).  
— Ajout en absence de levures  
— Ajout en présence de levures à T=12 minutes

En conditions de vinifications réelles, il est difficile de contrôler précisément la quantité d'oxygène transféré au moût, car de nombreuses étapes technologiques concourent à la dissolution d'oxygène dans le moût (remplissages, pompages, remuage, filtrations, micro-oxygénation (3, 13, 23, etc).

Ainsi, souvent, beaucoup plus d'oxygène que ce que les cellules de levures ont réellement besoin se trouve ainsi dans le milieu.

Dans de telles conditions, le surplus d'oxygène est consommé par les levures par des voies de consommation alternatives (appelées NOC), caractérisées par une très forte affinité pour l'oxygène, et associées à la production d'espèces réactives de l'oxygène tel que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> (14). De plus, lorsque des niveaux excessifs d'oxygène sont consommés par les levures sans qu'elles ne l'utilisent pour la synthèse de stérols, le contenu en stérols des levures décroît par oxydation spécifique, ce qui conduit à une chute violente de la viabilité cellulaire, effet qui est exactement à l'opposé de celui escompté (5).

Dans de nombreuses fermentations spontanées, une grande part de la fermentation alcoolique peut être réalisée par une micro flore

sauvage, provenant de la surface des fruits ou des surfaces des équipements de la cave (6). Dans de telles conditions, la disponibilité en oxygène pendant les premières étapes de la fermentation peut favoriser la rémanence de levures de genre non-*Saccharomyces*, pouvant entraîner des déviations organoleptiques (7). Par opposition, une addition d'oxygène sélective en fin de phase de croissance, lors de cultures mixtes de levures, permet de favoriser, au contraire, les levures du genre *Saccharomyces* (10).

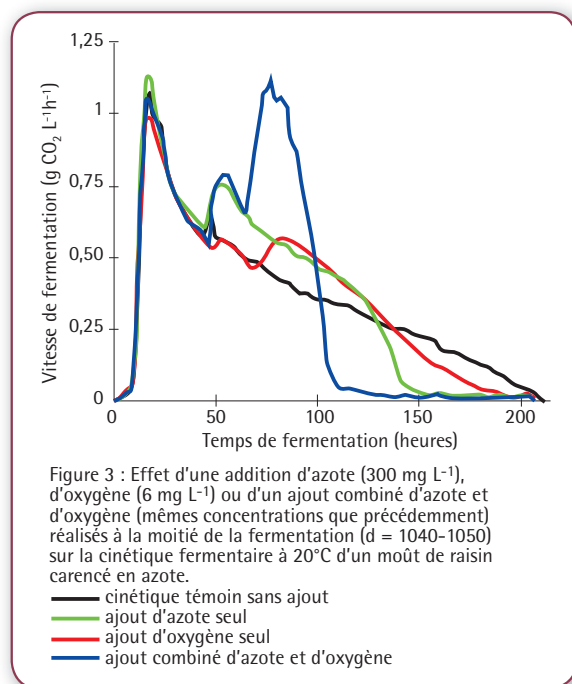
### 3 Efficacité de l'oxygénation et des ajouts combinés oxygène azote assimilable

En conditions de fermentation de type œnologique, l'addition d'oxygène sous forme d'oxygène ou d'air est une pratique légale, et est généralement utilisée lorsqu'une fermentation languissante est suspectée (18).

Dans ces conditions, l'addition d'oxygène n'est efficace qu'à la fin de la phase de croissance cellulaire (16, 17), lorsque les levures ont dilué leurs réserves propres en stérols. Il est toutefois difficile d'ajouter de faibles quantités d'oxygène au moût en fermentation : il est impossible de quantifier la quantité transférée au moût, les levures consommant l'oxygène au fur et à mesure de son addition. Toutefois, ni la vitesse de fermentation, ni la composition du milieu n'influencent la vitesse de transfert de l'oxygène au moût (3).

Dans de telles conditions, il est donc possible de calibrer tout appareil de transfert d'oxygène par utilisation d'un moût ne présentant pas de consommation d'oxygène : si une telle calibration n'est pas effectuée, on peut considérer que, dans la plupart des systèmes d'injection d'oxygène au moût, le taux réel de transfert n'est, au mieux, que de 50 % de l'oxygène injecté.

En conditions œnologiques, l'efficacité d'ajouts couplés d'oxygène et d'azote ammoniacal (DAP, 300 mg L<sup>-1</sup>) a été étudiée par Blateyron et al. (2000). De tels ajouts couplés doivent être réalisés au début de la phase stationnaire, un peu avant la mi-fermentation. Ils se sont révélés efficaces sur 72 moûts donnant lieu à des arrêts de fermentation ou des fermentations languissantes, en conduisant systématiquement à un épuisement des sucres et à une baisse moyenne de 44 % de la durée de fermentation, quelque soit le cépage, l'origine du moût et la souche de levure utilisée (figure 3).



Dans le cas de moûts ne conduisant pas à des problèmes fermentaires, de tels ajouts ont permis également de faire fortement baisser la durée de fermentation (en moyenne de 35 %). Une addition conjointe d'azote et d'oxygène est donc quasiment toujours efficace, même lorsqu'elle n'est pas indispensable.

Il faut également noter que l'efficacité des ajouts d'oxygène peut varier entre souches de levures, ce qui représente l'une de leur caractéristique au même titre que leurs besoins en azote assimilable pour la croissance (9).

### 4 Effets de l'oxygénation et des lipides sur les caractéristiques du vin

L'addition d'oxygène peut aussi avoir un impact sur le métabolisme levurien. Cet effet s'exerce notamment sur les concentrations en alcools supérieurs et esters correspondants.

En effet, une oxygénation menée au bon moment possède un effet similaire à une addition de lipides, et peut avoir un impact significatif sur l'acidité volatile en limitant la production de façon très sensible. Dans de telles conditions, la production d'esters devient également plus faible.

D'un point de vue sensoriel, Blateyron et al. (2000) n'ont détecté aucun impact pour des ajouts de 5 mg L<sup>-1</sup> d'oxygène en début de phase stationnaire, alors que cet impact devenait très négatif, aussi bien au niveau de la couleur que des arômes, lorsque la quantité ajoutée était excessive (50 mg L<sup>-1</sup>).

Les conséquences de l'oxygénation du moût sur la synthèse par la levure et la conservation des thiols variétaux comme ceux du sauvignon blanc sont encore mal comprises. Si l'essentiel des données actuellement disponibles concerne avant tout l'effet de l'oxygène pendant l'élevage et le stockage, une étude récente a permis de démontrer que des ajouts d'oxygène réalisés en fin de phase de croissance n'avaient aucun effet significatif sur la révélation des arômes variétaux caractéristiques du sauvignon blanc (22).

### 5 La mesure du potentiel d'oxydoréduction et sa signification

Les différents composants moléculaires d'un vin existent naturellement sous forme d'un mélange de leurs formes oxydées et réduites. En fait, la réduction d'un composé cause l'oxydation d'un autre, jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint, où toutes les réactions d'oxydation sont en équilibre avec les réactions de réduction. La valeur de ce potentiel d'oxydoréduction à l'équilibre est extrêmement dépendante de la valeur du pH du vin, mais également, de la teneur en oxygène dissous dans ce même vin.

L'évolution du potentiel d'oxydoréduction, mesuré à l'aide d'une électrode dans un vin au cours de son élaboration, a été étudiée depuis longtemps (12). De façon générale, pendant la fermentation alcoolique, le potentiel d'oxydoréduction du milieu (mesuré à l'aide d'électrode Ag/AgCl) décroît fortement d'une valeur de 300-350 mV jusqu'à des valeurs faibles 50 à 100 mV au moment de la vitesse maximale de fermentation, pour finir en fin de fermentation, à des valeurs variant de 100 à 150 mV (20-21).

En fait, lors d'un ajout ponctuel d'oxygène à un moût, on peut observer une remontée brusque du potentiel d'oxydoréduction proportionnelle à la quantité d'oxygène transférée. Toutefois cette valeur ne redescend que très lentement, alors qu'il n'y a déjà plus trace d'oxygène dissous dans le moût. Cet effet "mémoire" traduit bien le fait qu'une partie de l'oxygène transféré au milieu a modifié les équilibres d'oxydoréduction au sein des différentes composantes moléculaires du vin.

## 6 Influence de l'oxygène sur les odeurs de "réduit" et les composés thiols volatils

La caractéristique "réduit" d'un vin est généralement associée à des valeurs de potentiel d'oxydoréduction basses, ainsi qu'à la présence de composés soufrés à odeurs désagréables.

L'une des caractéristiques de tels composés soufrés est qu'ils possèdent des valeurs d'équilibre d'oxydoréduction extrêmement basses (aux alentours de - 220 mV).

Cela signifie donc qu'à des valeurs de potentiel d'oxydoréduction au dessus de cette valeur, ces composés sont majoritairement sous forme oxydée, donc beaucoup moins volatils, et avec des seuils de perception olfactive beaucoup plus élevés.

Ainsi, en cours de fermentations strictement anaérobies, au moment où l'activité fermentaire est à son maximum, les niveaux de potentiel d'oxydoréduction peuvent atteindre des valeurs assez basses pour faire apparaître des odeurs de type "réduit". Un ajout d'oxygène réalisé à ce moment-là peut alors faire basculer les équilibres d'oxydoréduction des composés soufrés à odeurs désagréables et restaurer un nez plus favorable.

De façon similaire et par le même mécanisme, un ajout trop prononcé d'oxygène par rapport aux besoins nutritionnels de la levure peut également conduire à l'accumulation transitoire d'oxygène dans le moût, ce qui peut entraîner également un effet néfaste sur la révélation des thiols volatils variétaux, caractéristiques flatteuses de nombreux cépages...

## Références bibliographiques

- 1 Andraesen AA, Stier TJB (1953) *Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium.* Journal of Cellular and Comparative Physiology, 41 : 23-36.
- 2 Andraesen AA, Stier TJB (1954) *Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium.* Journal of Cellular and Comparative Physiology, 43 : 271-281.
- 3 Blateyron L, Aguera E, Dubois C, Sablayrolles JM (1998) *Control of oxygen additions during alcoholic fermentations.* Wein-Wissenschaft, 53 : 131-135.
- 4 Blateyron L, Julien A, Sablayrolles JM (2000) *Stuck fermentations - O<sub>2</sub> and nitrogen requirements - importance of optimizing their addition.* Lallemand Research Meeting, Vienne, Autriche.
- 5 Fornairon-Bonfond C, Desmaretz V, Rosenfeld E, Salmon JM (2002) *Oxygen addition and sterol synthesis in Saccharomyces cerevisiae during enological fermentation.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 93 : 176-182.
- 6 Fleet GH (1990) *Growth of yeasts during wine fermentations.* Journal of Wine Research, 1 : 211-213.
- 7 Hansen EH, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC, Arneborg N (2001) *The effect of oxygen on the survival of non-Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Applied Microbiology, 91 : 541-547.
- 8 Houtman AC Du Plessis CS (1986) *Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation.* South African Journal of Enology and Viticulture 7 : 39-46
- 9 Julien A, Roustan JL, Dulau L, Sablayrolles JM (2000) *Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences.* American Journal of Enology and Viticulture 51 : 215-222.
- 10 Languet P, Aguera E, Samson A, Ortiz-Julien A, Salmon JM (2005) *Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-Saccharomyces et Saccharomyces.* Revue des Œnologues, 117 : 31-33.
- 11 Luparia V, Soubeyrand V, Berges T, Julien A, Salmon JM (2004) *Assimilation of grape phytosterols by Saccharomyces cerevisiae and their impact on enological fermentations.* Applied Microbiology and Biotechnology, 65 : 25-32.
- 12 Ribéreau-Gayon J (1933) *Contribution à l'étude des oxydations et réductions dans les vins : application à l'étude du vieillissement et des casses.* 2<sup>nd</sup> édition, Delmas Ed., Bordeaux.
- 13 Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (1998) *L'influence des différentes opérations du travail du vin.* In P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, & D. Dubourdieu. 2-Chimie du vin. Stabilisation et traitements (pp. 459-462). Paris : Dunod.
- 14 Rosenfeld E, Beauvoit B, Rigoulet M, Salmon JM (2002) *Non-respiratory oxygen consumption pathways in anaerobically-grown Saccharomyces cerevisiae: evidence and partial characterization.* Yeast, 19 : 1299-1322.
- 15 Rosenfeld E, Beauvoit B, Blondin B, Salmon JM (2003) *Oxygen consumption by anaerobic Saccharomyces cerevisiae in enological conditions: effect on fermentation kinetics.* Applied and Environmental Microbiology, 69 : 113-121.
- 16 Sablayrolles JM (1996) *Sluggish and stuck fermentations. Effectiveness of ammoniacal nitrogen and oxygen additions.* Viticulture and Enology Science 51 : 147-151.
- 17 Sablayrolles JM, Barre P (1986) *Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions œnologiques simulées.* Sciences des Aliments, 6 : 373-383.
- 18 Sablayrolles JM, Salmon JM, Barre P (1996) *Carences nutritionnelles des moûts. Efficacité des ajouts combinés d'oxygène et d'azote ammoniacal.* Revue Française d'Œnologie, 159 : 25-32.
- 19 Salmon JM, Fornairon C, Barre P (1998) *Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of Saccharomyces cerevisiae during enological fermentation.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 86 : 154-163.
- 20 Salmon JM (2004) *Redox et levure.* In "L'état d'oxydoréduction : objectifs et état des recherches en 2004", CRECEP Bourgogne Ed., 20-21.
- 21 Salmon JM (2005). *Phénomènes d'oxydoréduction pendant la fermentation alcoolique et l'autolyse levurienne.* Revue Française d'Œnologie, 211 : 16.
- 22 Subileau M, Schneider R, Salmon JM, Degryse E (2008) *Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon Blanc at the level of precursor transport.* FEMS Yeast Research, 8 : 771-780.
- 23 Vidal JC, Dufoucq T, Boulet JC, Moutounet M (2001) *Les apports d'oxygène au cours des traitements des vins. Bilan des observations sur site, 1<sup>ère</sup> partie.* Revue Française d'Œnologie, 190 : 24-31.