

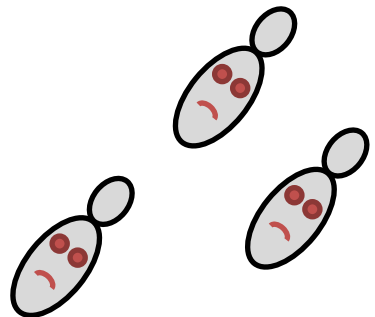
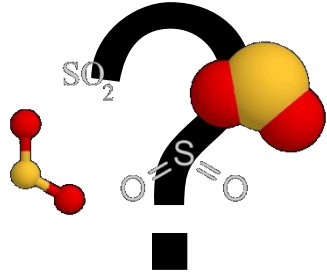
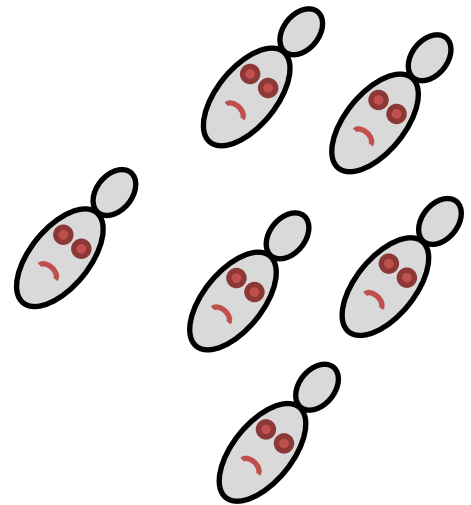
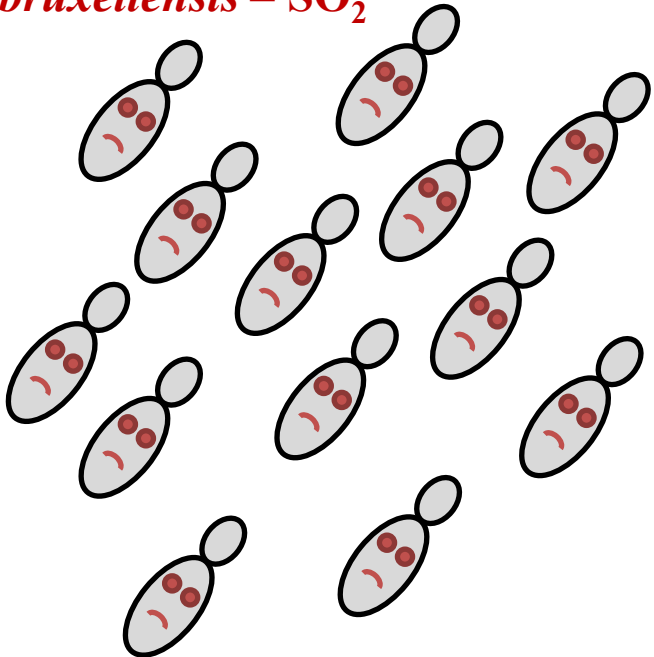
L'efficacité des sulfites sur *B. bruxellensis* dépend de la population présente

Cédric Longin, Claudine Degueurce, Frédérique Juillat,
Sandrine Rousseaux, Michèle Guilloux-Bénatier, Hervé Alexandre

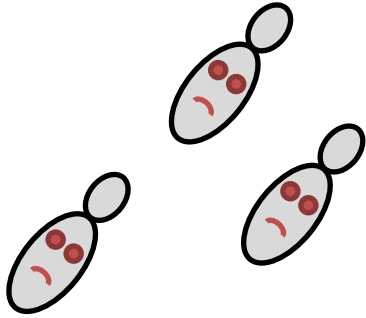
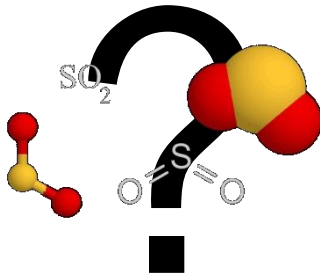
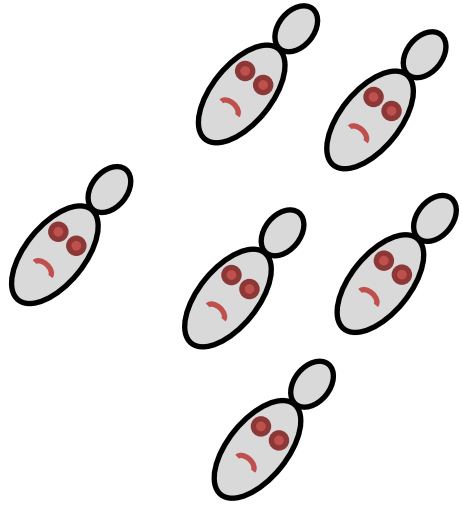
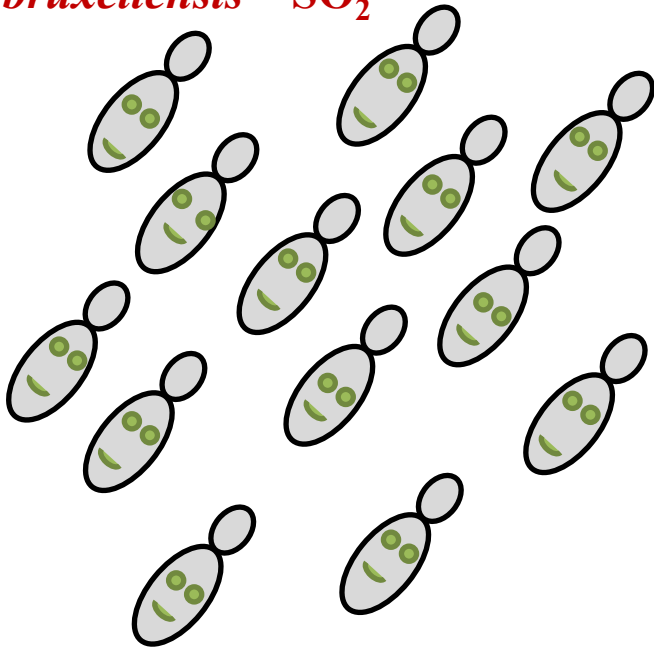
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (Dijon)



B. bruxellensis – SO₂



B. bruxellensis – SO₂



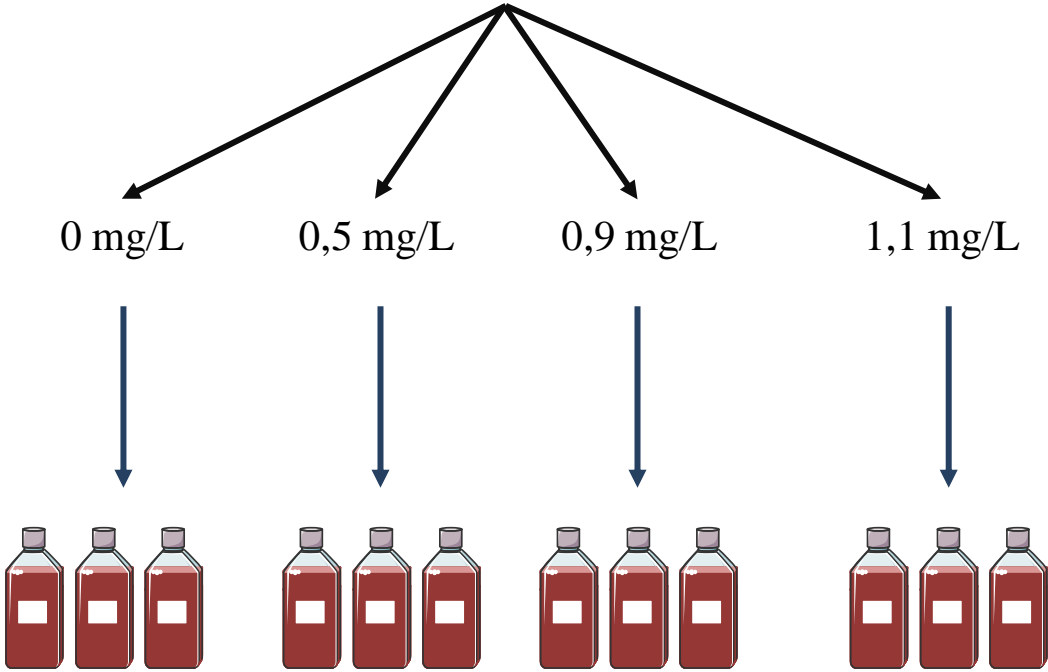
Une forte population en vin limite-t-elle l'effet du SO₂?

B. bruxellensis – SO₂

Souches : LO2E2 et LO417

Populations : 10³, 10⁴ et 10⁵ cellules/mL

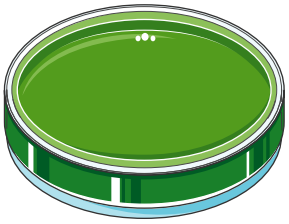
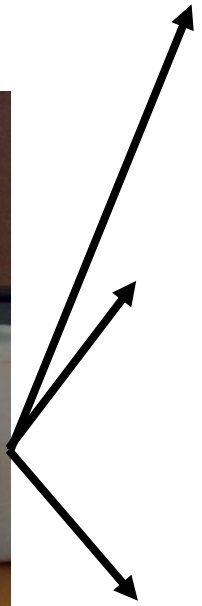
Doses expérimentales de SO₂ moléculaire



- Pas d’ajustement du SO₂ au cours du temps
- Incubation à température constante 22°C
- Suivi de la population pendant 50 jours

<u>Conditions</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
SO ₂ total ajouté (mg/L)	0	25	36	43
SO ₂ libre (mg/L)	0	10	16	20
SO ₂ moléculaire (mg/L)	0	0,5	0,9	1,1

B. bruxellensis – SO₂



Dénombrement sur boîtes de Pétri

Milieu sélectif ITV



Dénombrement par cytométrie en flux

Population totale

Viabilité: marquage FDA



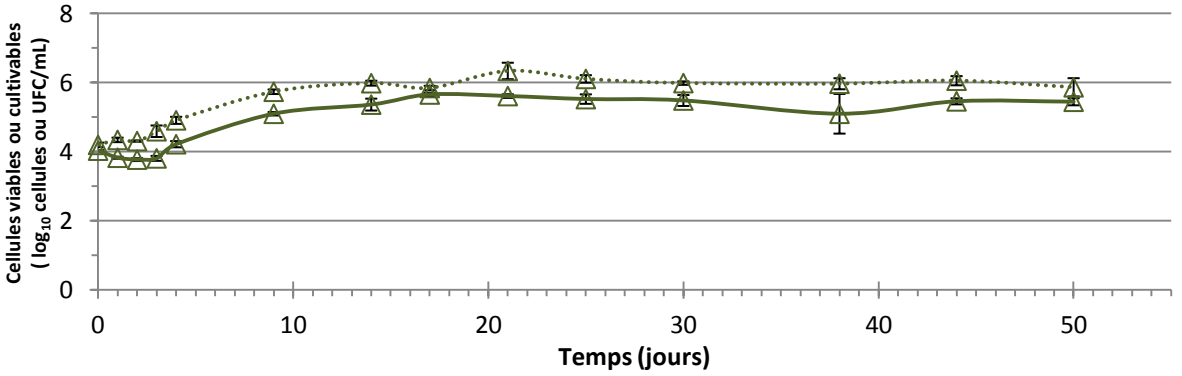
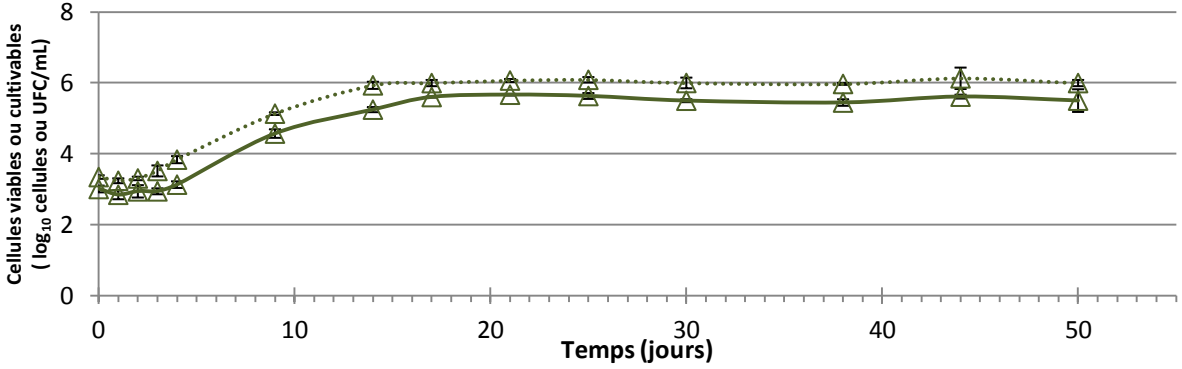
UHPLC

HClass UPLC system (Waters)

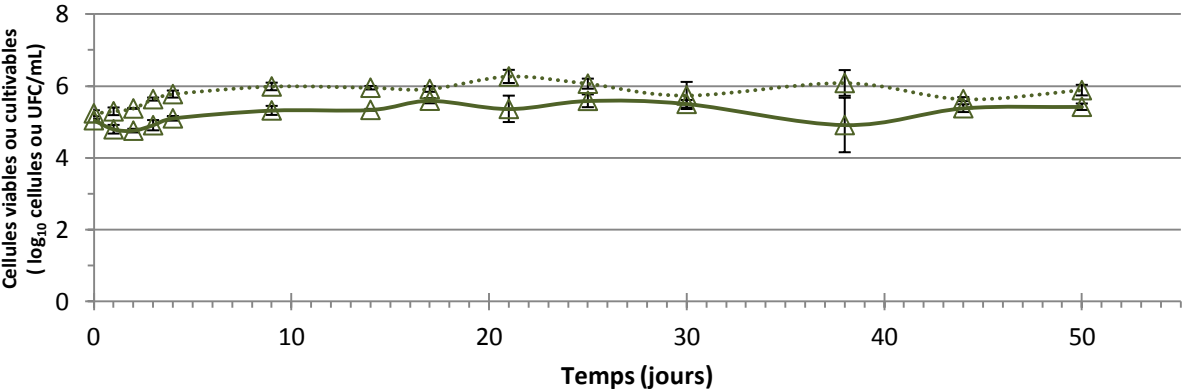
Coreshell Raptor ARC-18 (2,7 µm; 100 x 3,0mm; 9314A1E)

B. bruxellensis – SO₂

Viabilité et cultivabilité de la souche LO2E2 au cours du temps

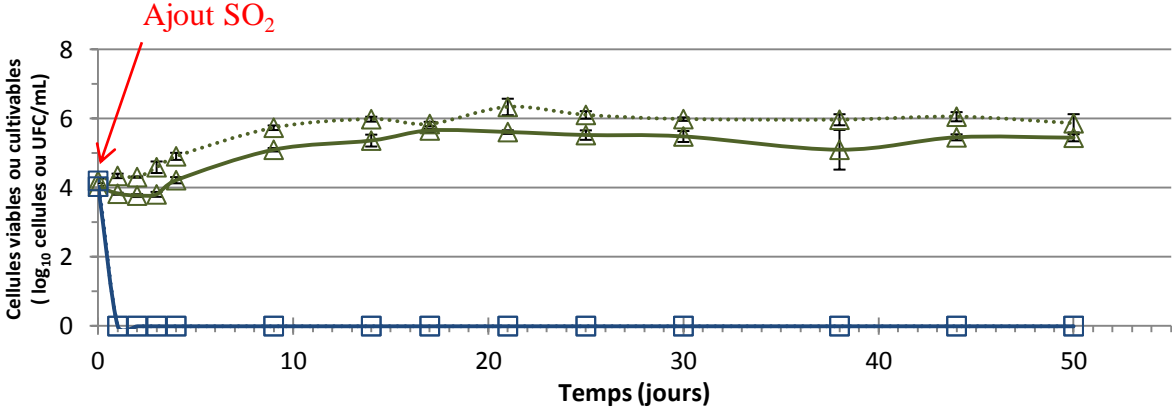
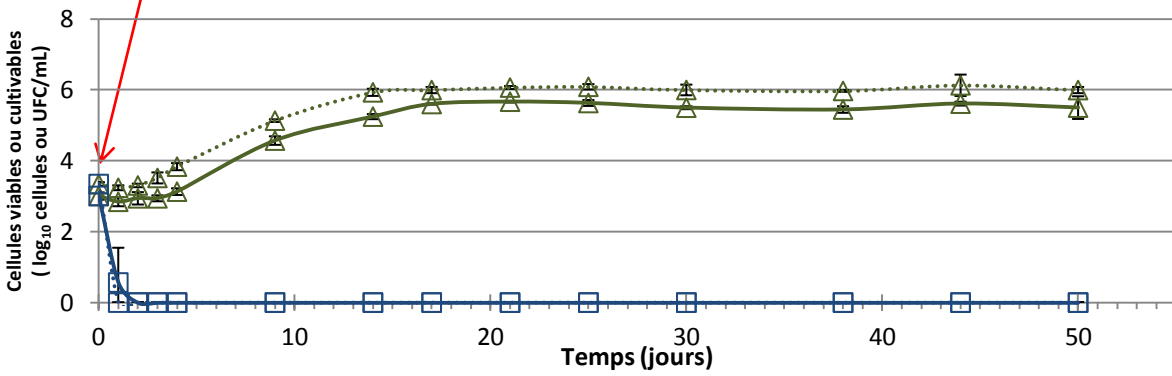


- △ Population viable de LO2E2 sans sulfite
- ...△ Population cultivable de LO2E2 sans sulfite



B. bruxellensis – SO₂

Viabilité et cultivabilité de la souche **LO2E2** au cours du temps

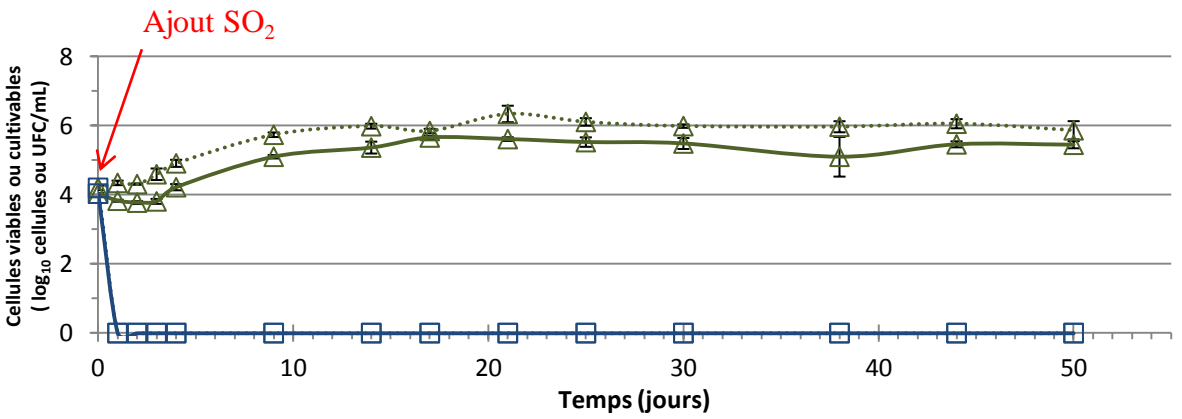
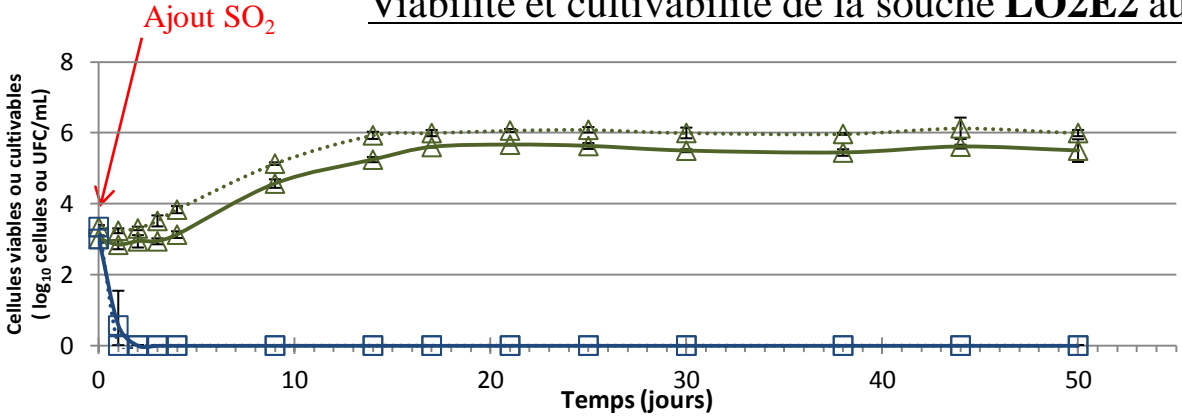


- Population viable de LO2E2 sans sulfite
- Population cultivable de LO2E2 sans sulfite
- Population viable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active

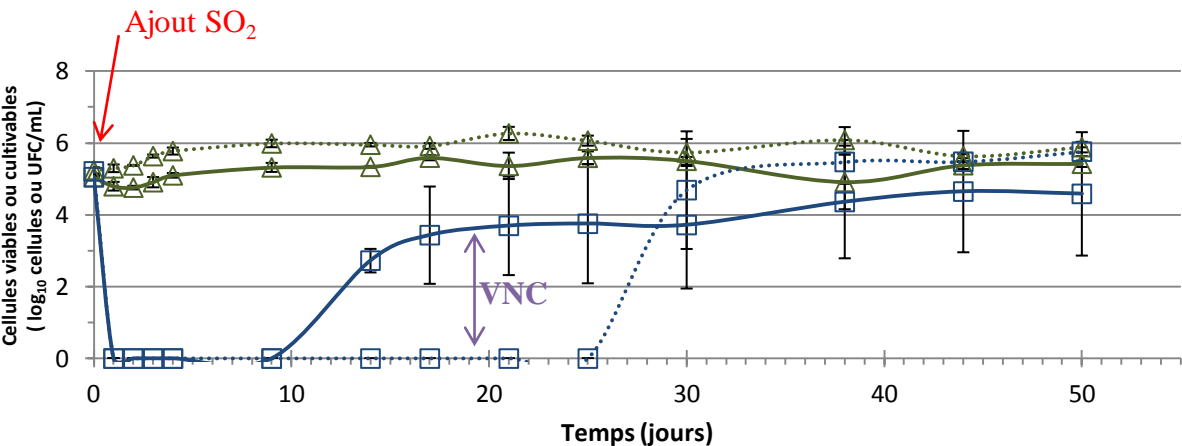
Ajout SO₂

B. bruxellensis – SO₂

Viabilité et cultivabilité de la souche **LO2E2** au cours du temps

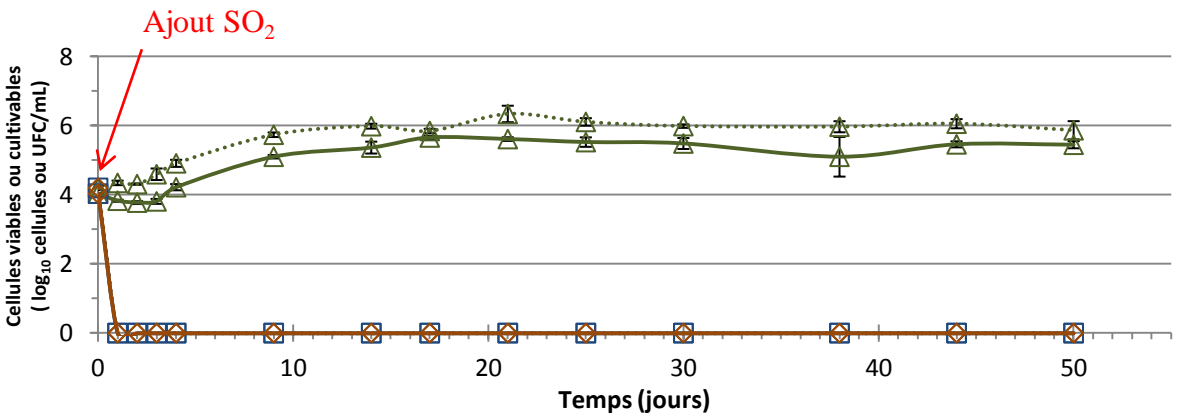
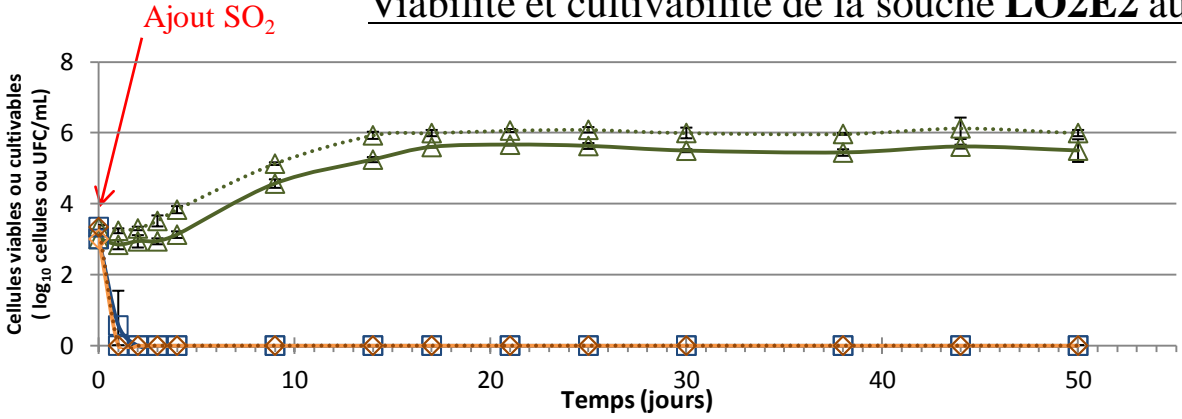


- Population viable de LO2E2 sans sulfite
- Population cultivable de LO2E2 sans sulfite
- Population viable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active

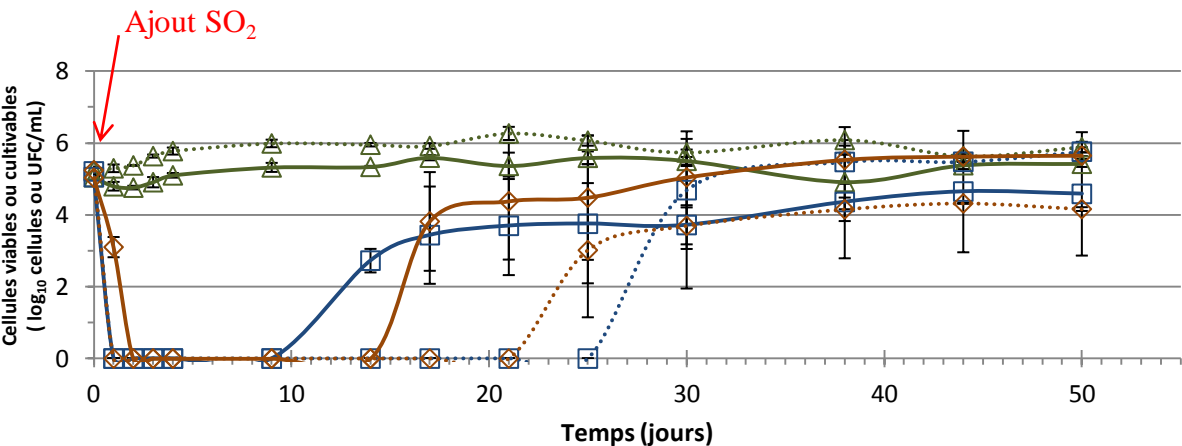


B. bruxellensis – SO₂

Viabilité et cultivabilité de la souche **LO2E2** au cours du temps

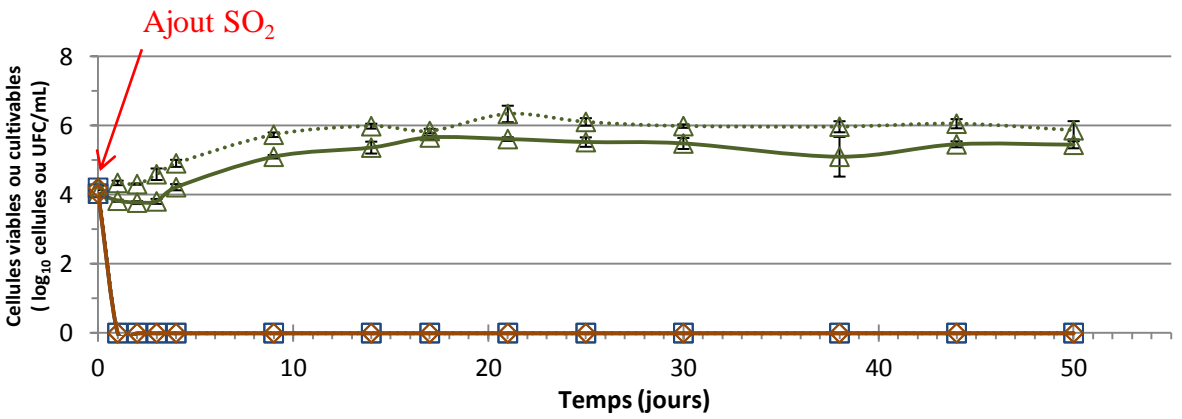
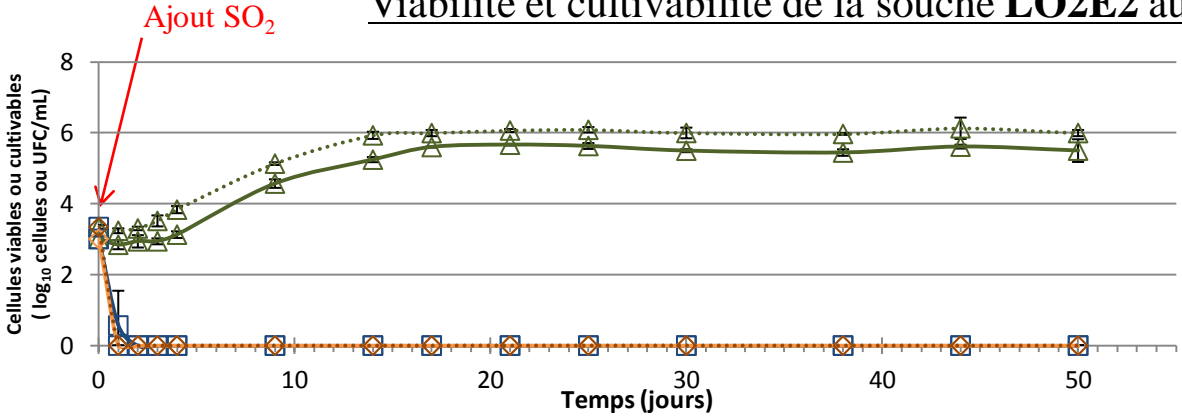


- Population viable de LO2E2 sans sulfite
- Population cultivable de LO2E2 sans sulfite
- Population viable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population viable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active

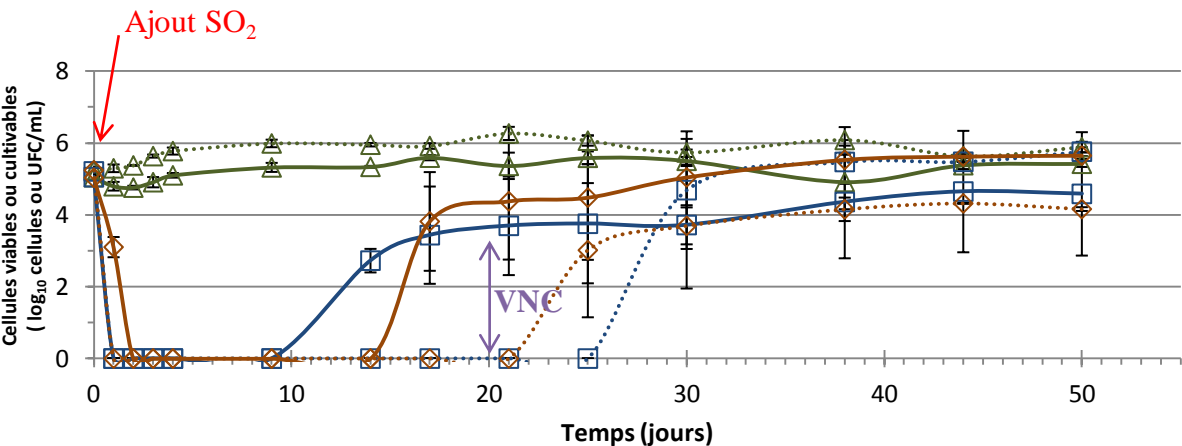


B. bruxellensis – SO₂

Viabilité et cultivabilité de la souche **LO2E2** au cours du temps

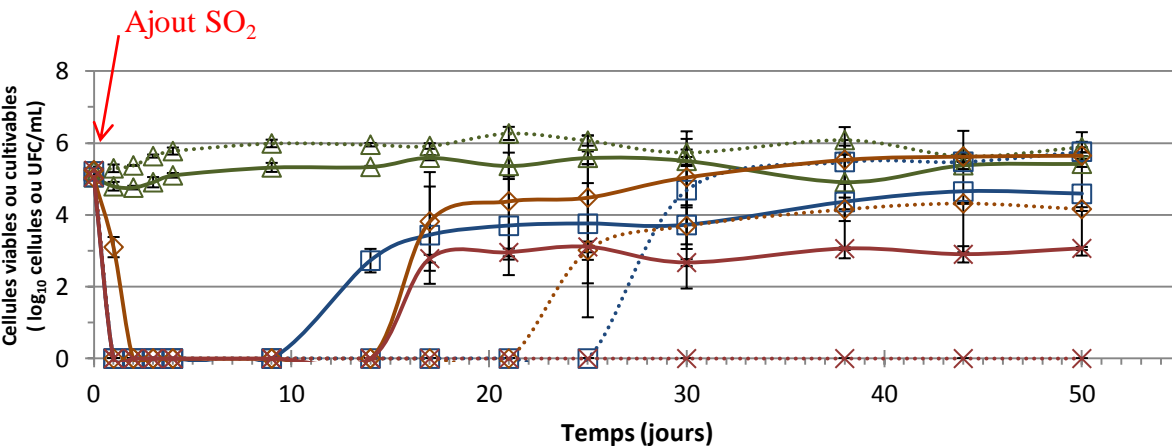
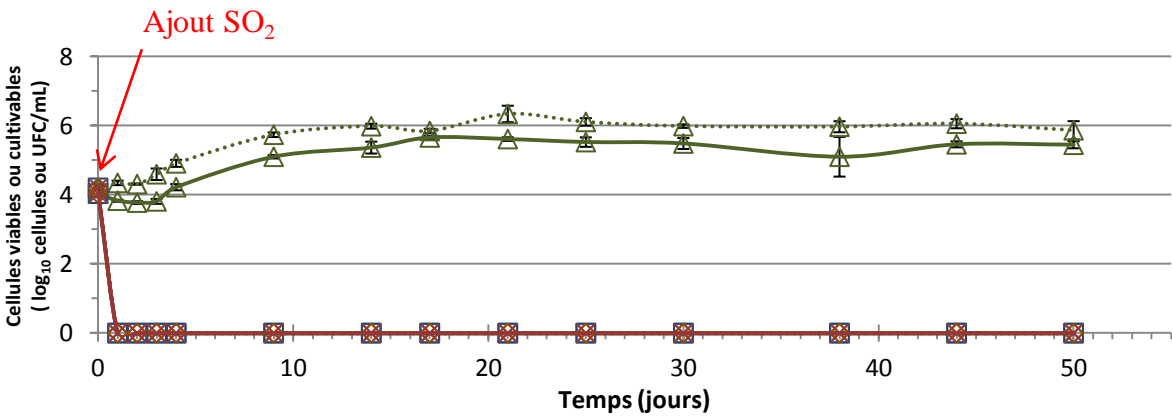
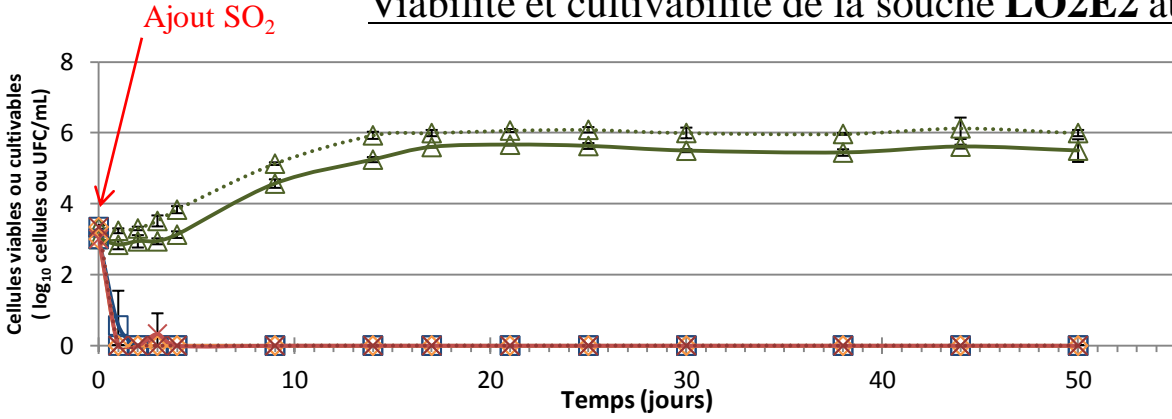


- Population viable de LO2E2 sans sulfite
- Population cultivable de LO2E2 sans sulfite
- Population viable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population viable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active



B. bruxellensis – SO₂

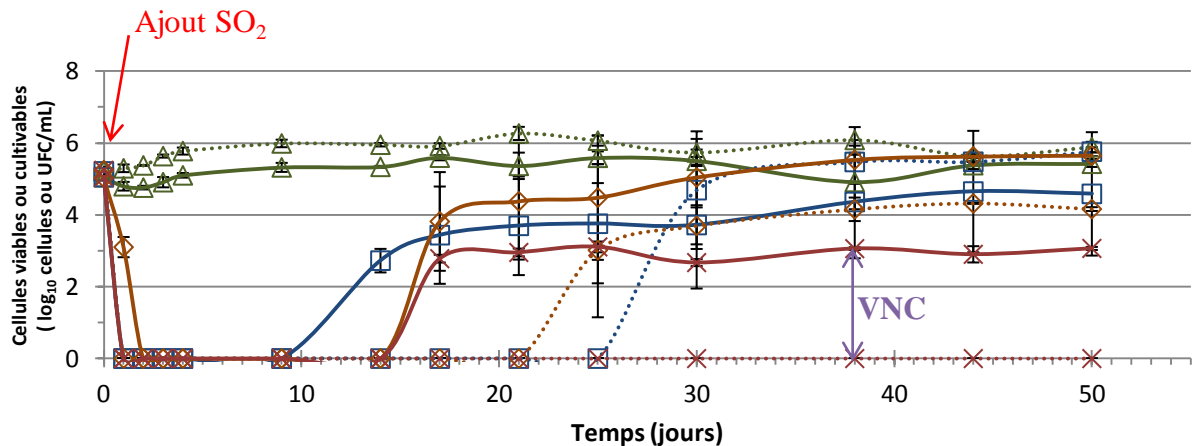
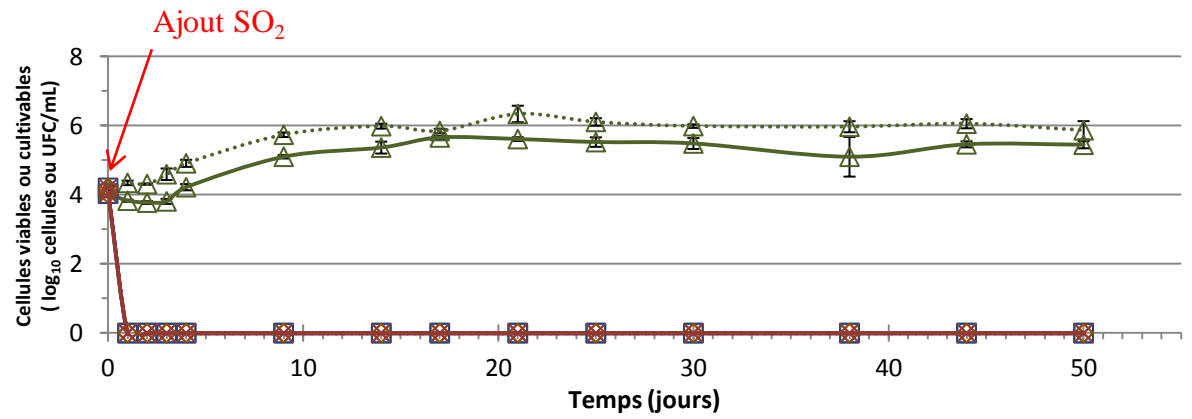
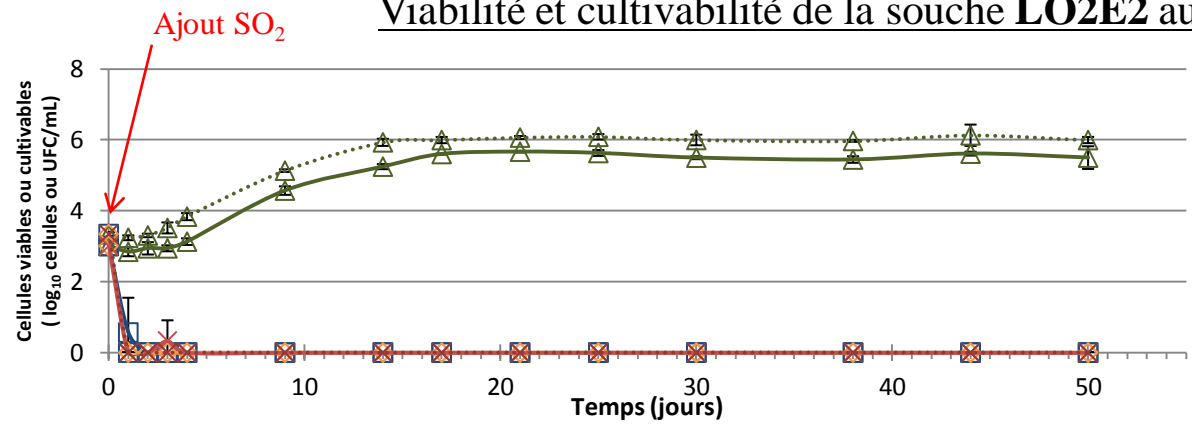
Viabilité et cultivabilité de la souche LO2E2 au cours du temps



- Population viable de LO2E2 sans sulfite
- Population cultivable de LO2E2 sans sulfite
- Population viable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population viable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- Population viable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite active

B. bruxellensis – SO₂

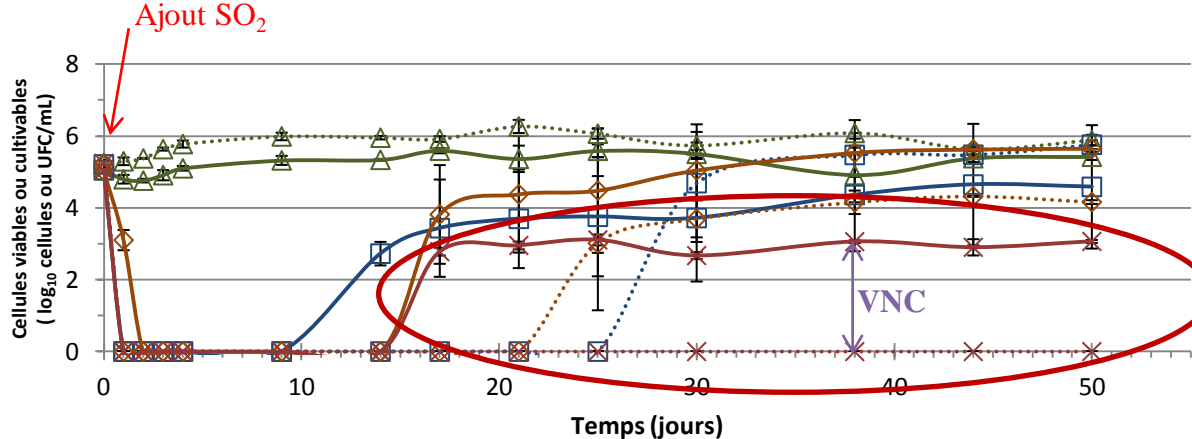
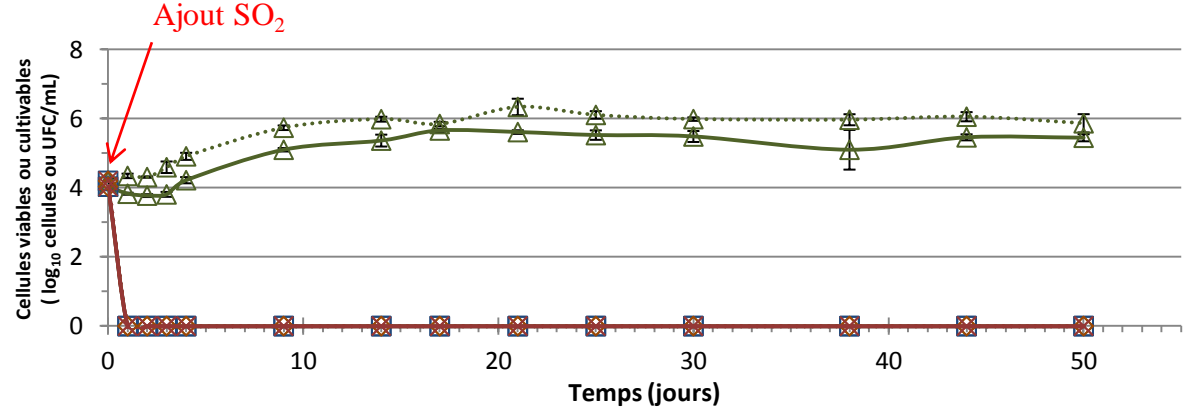
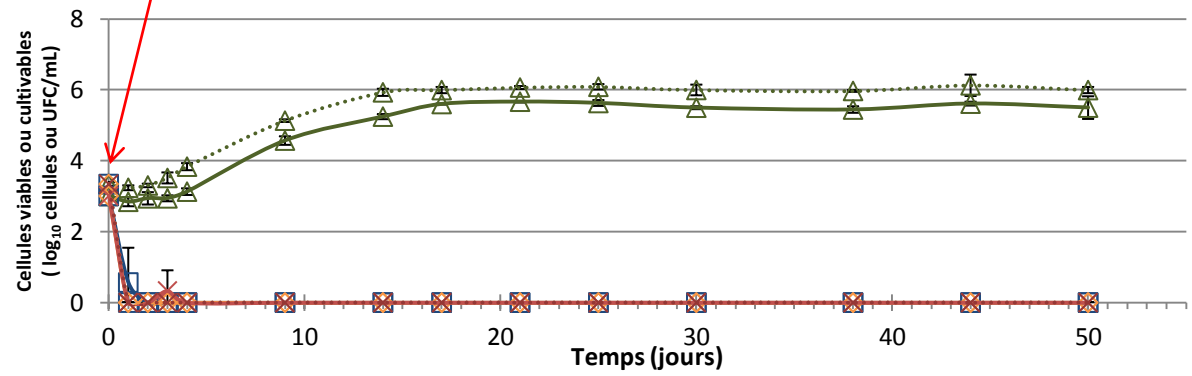
Viabilité et cultivabilité de la souche **LO2E2** au cours du temps



- Population viable de LO2E2 sans sulfite
- Population cultivable de LO2E2 sans sulfite
- Population viable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population viable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- Population viable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite active

***B. bruxellensis* – SO₂**

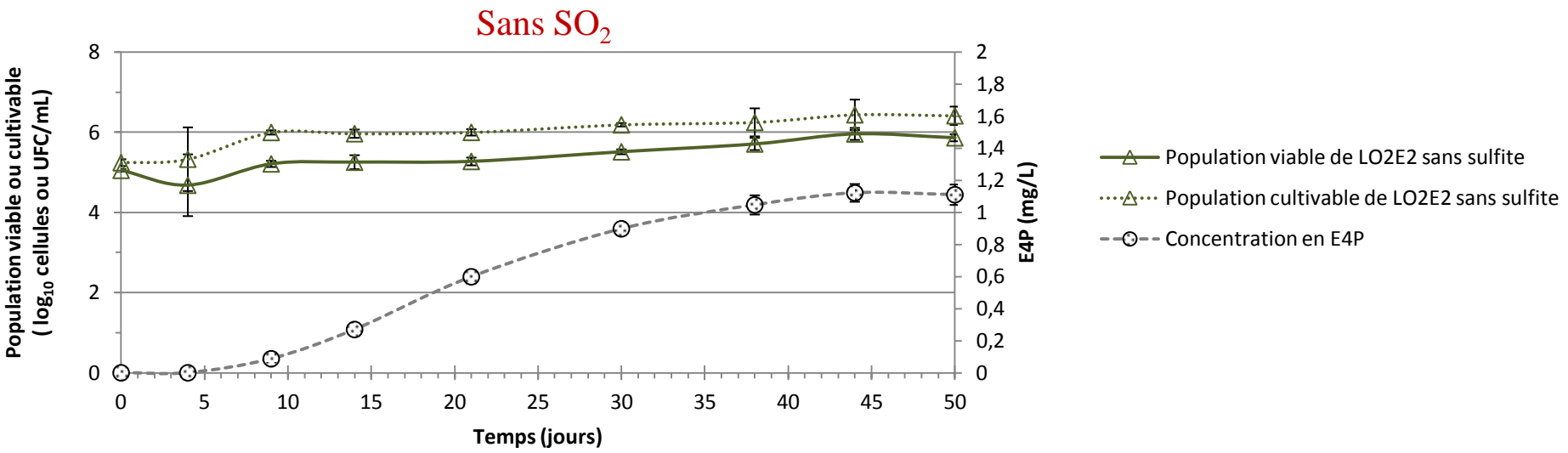
Viabilité et cultivabilité de la souche **LO2E2** au cours du temps



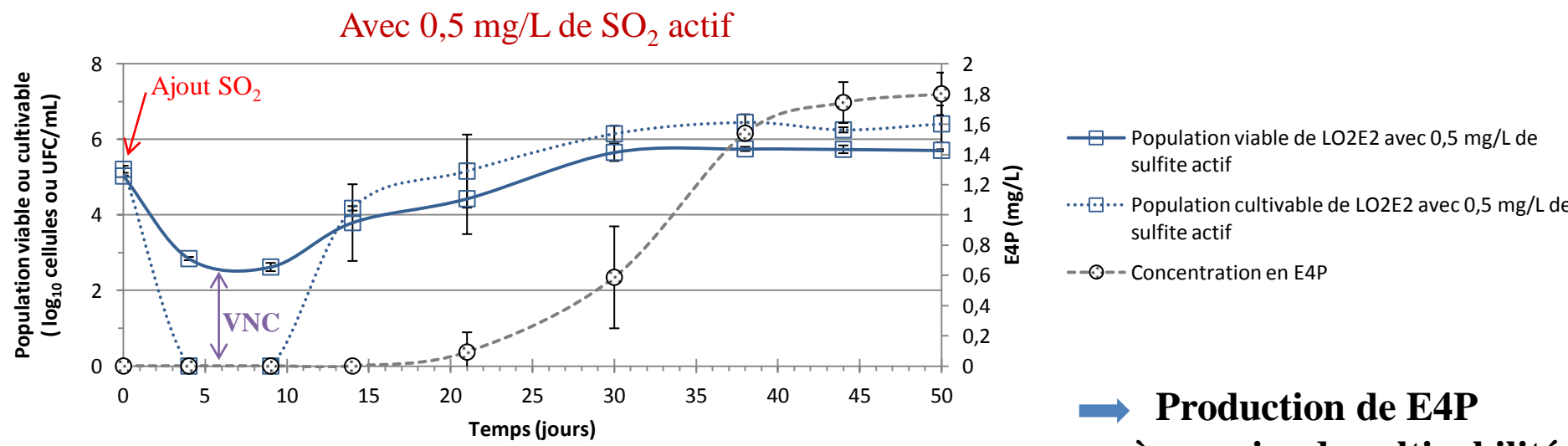
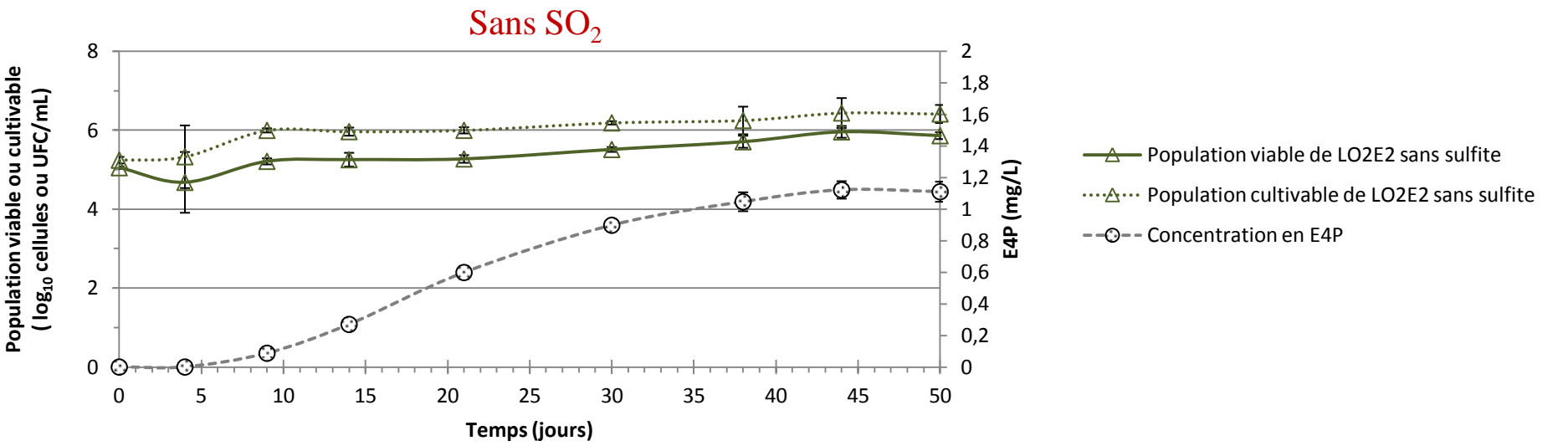
- △— Population viable de LO2E2 sans sulfite
- △··· Population cultivable de LO2E2 sans sulfite
- Population viable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,5 mg/L de sulfite active
- ◇— Population viable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- ◇··· Population cultivable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite active
- ×— Population viable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite active
- ×··· Population cultivable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite active

Production de phénols volatils?
 (Agnolucci et al., 2010; Zuehlke & Edwards, 2013
 ≠ Serpaggi et al., 2012)

B. bruxellensis LO2E2 en vin rouge enrichi en acide *p*-coumarique

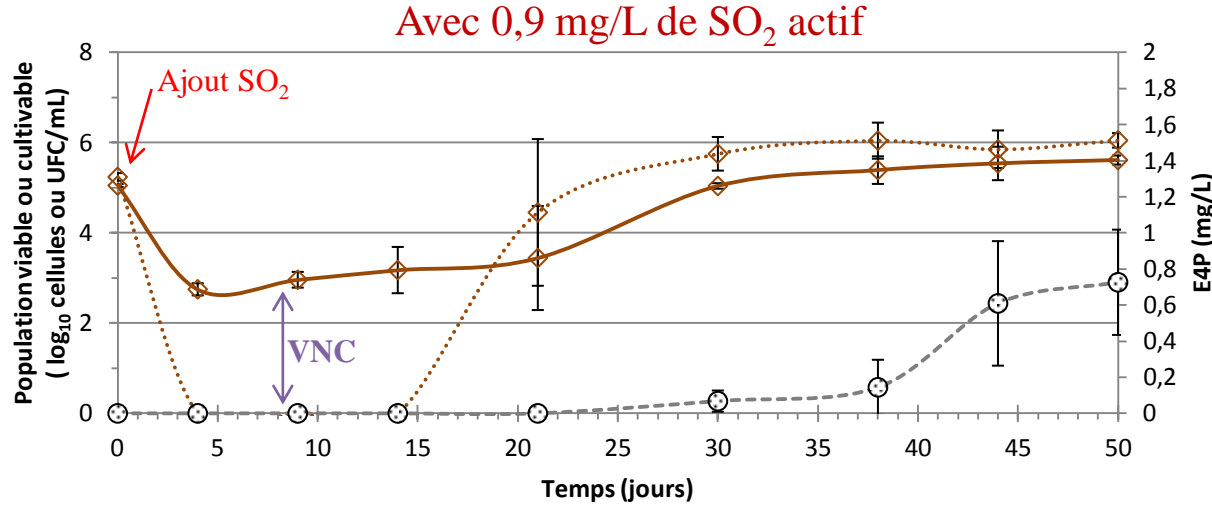


B. bruxellensis LO2E2 en vin rouge enrichi en acide *p*-coumarique



➔ Production de E4P après reprise de cultivabilité

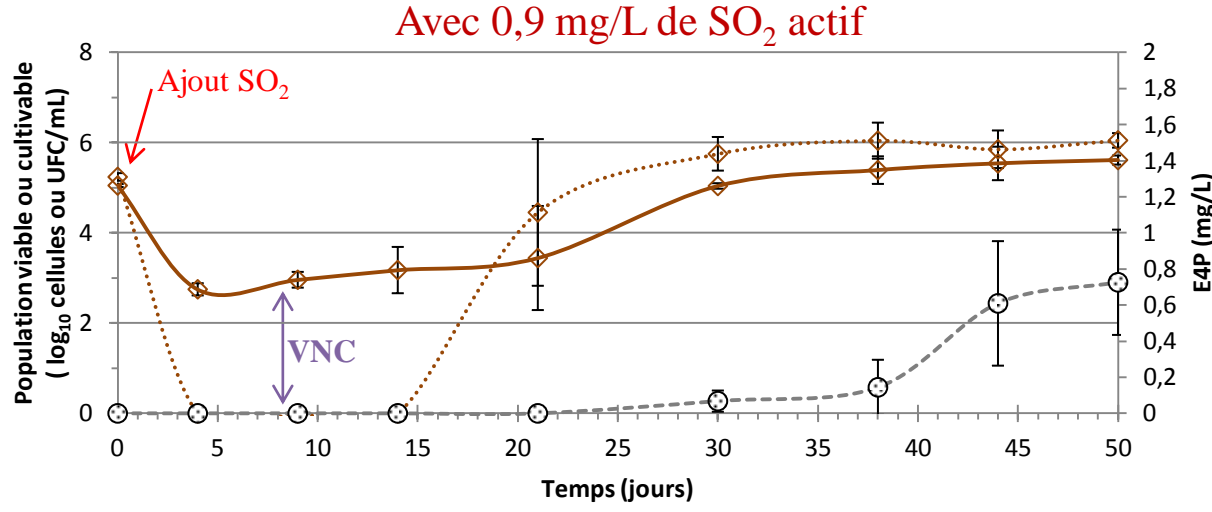
B. bruxellensis LO2E2 en vin rouge enrichi en acide *p*-coumarique



- Population viable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite actif
- Population cultivable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite actif
- Concentration en E4P

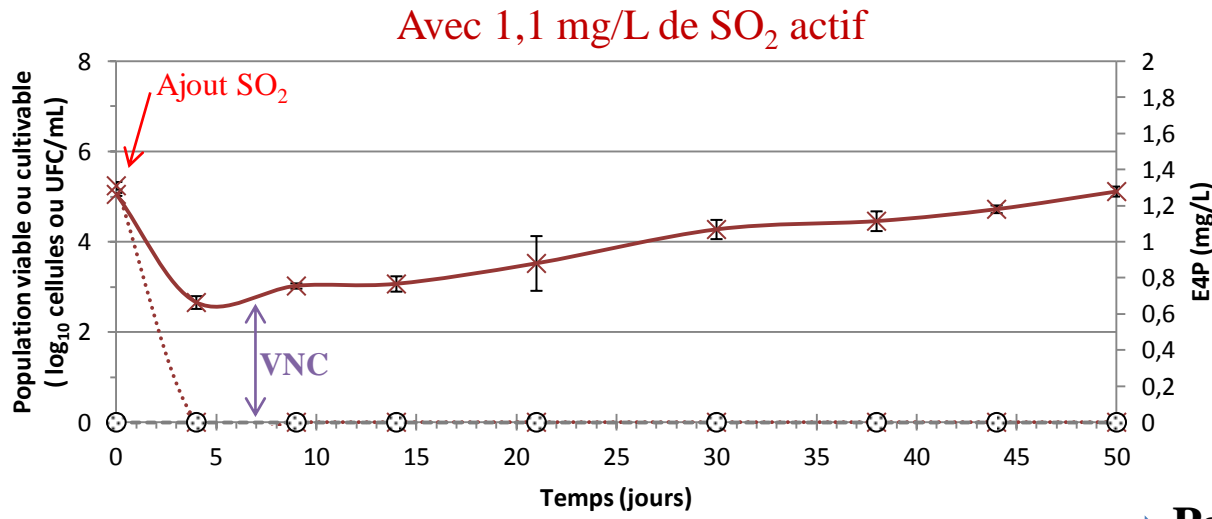
➡ **Production de E4P après reprise de cultivabilité**

B. bruxellensis LO2E2 en vin rouge enrichi en acide *p*-coumarique



- ◇— Population viable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite actif
- ◇··· Population cultivable de LO2E2 avec 0,9 mg/L de sulfite actif
- Concentration en E4P

➡ **Production de E4P après reprise de cultivabilité**



- ×— Population viable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite actif
- ×··· Population cultivable de LO2E2 avec 1,1 mg/L de sulfite actif
- Concentration en E4P

➡ **Pas de production de E4P en VNC**

B. bruxellensis – SO₂

Confirmation de l'**effet souche** (souche LO2E2 plus sensible que la souche LO417)

Pour une même dose de SO₂, résistance différente selon la **population** présente

État VNC: souche dépendant, population dépendant

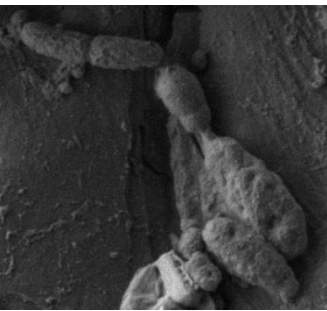
***B. bruxellensis* – SO₂**

Confirmation de l'effet souche (souche LO2E2 plus sensible que la souche LO417)

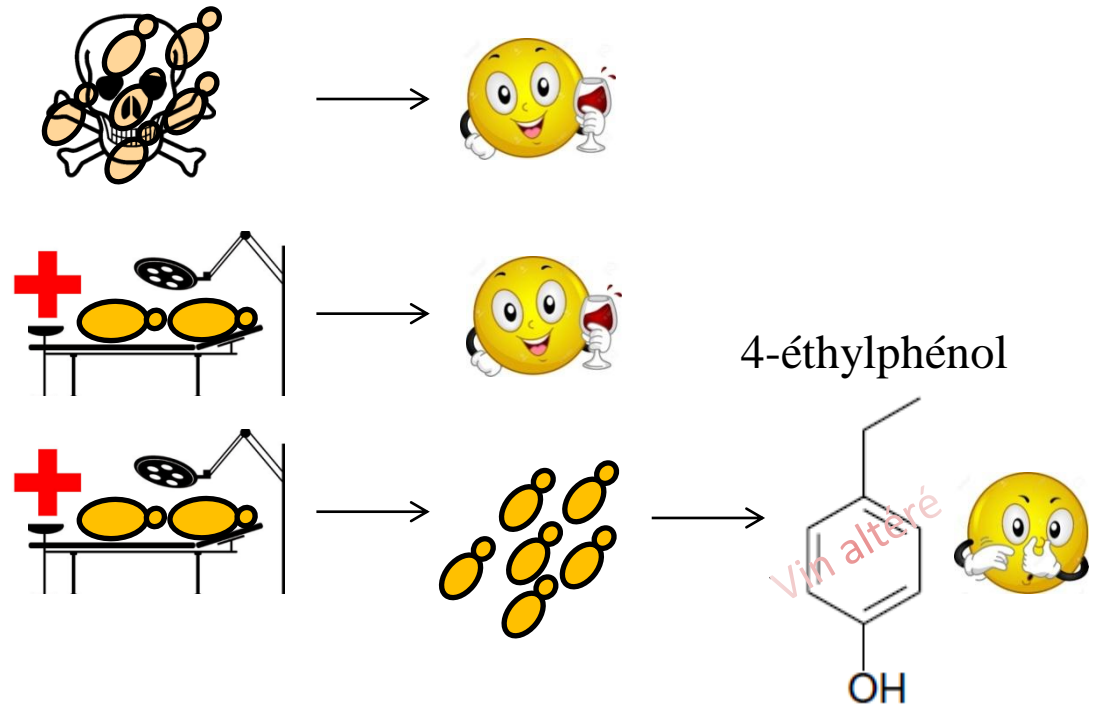
Pour une même dose de SO₂, résistance différente selon la **population** présente

État VNC: souche dépendant, population dépendant

B. bruxellensis avec SO₂ en vin rouge



- Selon :**
- concentration en sulfite
 - population cellulaire
 - temps
 - tolérance des souches présentes





Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine



Cédric Longin*, Claudine Degueurce, Frédérique Julliat, Michèle Guilloux-Benatier, Sandrine Rousseaux, Hervé Alexandre

Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Equipe VAIMIS, rue Claude Ladréy, BP 27877, F-21078 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2016

Received in revised form 24 August 2016

Accepted 17 September 2016

Available online 19 September 2016

Keywords:

B. bruxellensis

Molecular sulfite

VBNC state

4-EP production

Red wine

ABSTRACT

Brettanomyces bruxellensis is considered as a spoilage yeast encountered mainly in red wine. It is able to reduce vinylphenols from phenolic acids to ethylphenols. These volatiles are responsible for the phenolic “Brett character” described as animal, farm, horse sweat and animal leather odors. Other molecules are responsible for organoleptic deviations described as “mousiness taint”. SO₂ is the product most often used by winemakers to prevent *B. bruxellensis* growth. Usually, the recommended molecular dose of SO₂ (active SO₂, mSO₂) is highly variable, from 0.3 to 0.8 mg/L. But these doses do not take into account differences of strain resistance to sulfites or population levels. Moreover, SO₂ is known as a chemical stressor inducing a viable but nonculturable (VBNC) state of *B. bruxellensis*. These cells, which are non-detectable by plate counting, can lead to new contamination when the amount of sulfite decreases over time. Consequently, we first assessed the effect of SO₂ levels in red wine on two strains with phenotypically different sulfite resistances. Then, we studied the relationship between amounts of SO₂ (0, 0.5, 0.9 and 1.1 mg/L active SO₂) and population levels (10³, 10⁴ and 10⁵ cells/mL) in red wine. Yeasts were enumerated by both plate counting and flow cytometry over time using viability dye. Our results showed different SO₂ resistances according to the strain used. A relationship between yeast population level and SO₂ resistance was demonstrated: the higher the yeast concentration, the lower the efficiency of SO₂. Under certain conditions, the VBNC state of *B. bruxellensis* was highlighted in red wine. Yeasts in this VBNC state did not produce 4-EP. Moreover, cells became culturable again over time. All these results provide new information enabling better management of sulfite addition during wine aging.



P' Hervé ALEXANDRE
Directeur de l'équipe VALMiS



D' Michèle GUILLOUX-BENATIER



Dr Cédric LONGIN

Merci de votre attention



Clément PETITGONNET



Claudine DEGUEURCE



Antoine ZBYRKO



Frédérique JULLIAT