



Développement d'une méthodologie de dosage du glutathion et glutathion oxydé dans les lies et les dérivés de levures

Delphine Winstel, Axel Marchal, Claudia Nioi

Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR OENO 1366, ISVV, F-33882 Villenave-d'Ornon, France

Les lies et les dérivés de levures sont employés en vinification pour améliorer et préserver les qualités organoleptiques des vins. Parmi les divers bienfaits de l'élevage sur lies sur la qualité des vins blancs, la protection vis-à-vis des phénomènes d'oxydation grâce au relargage du glutathion (GSH) a été bien décrite. Des études plus récentes montrent aussi que les dérivés de levures riches en GSH ont une capacité à préserver les vins des phénomènes oxydatifs. Le dosage précis du GSH dans ces matrices levuriennes est donc nécessaire pour mieux maîtriser leur utilisation en vinification. Cet article propose une méthodologie optimisée d'extraction et d'analyse du glutathion dans sa forme réduite et oxydée dans ces deux matrices, lies et dérivés de levures.

Contexte

Le glutathion (GSH) est un tripeptide présent dans divers aliments et boissons, dont le moût de raisin et le vin, sous sa forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG)¹. Lors du vieillissement sur lies, le GSH relargué permet de limiter les phénomènes d'oxydation du vin^{1,2,3}. La macération pré-fermentaire, le pressurage doux dans des conditions inertes, l'élevage sur lies et l'utilisation de dérivés de levures (DL) enrichis en glutathion sont de bonnes pratiques pour protéger et augmenter les niveaux de GSH dans les vins^{2,3,4}.

Les DL sont des préparations obtenues à partir de levures *Saccharomyces cerevisiae* et/ou non-*Saccharomyces*⁵. Des études récentes ont montré les propriétés antioxydantes de ces composés⁶. La protection contre l'oxydation observée dans les vins traités avec les DL, comme dans le cas de l'élevage sur lies, semble être liée à leur capacité de consommer l'O₂ et à la présence du GSH⁴. Néanmoins, si les quantités de GSH présentes dans le vin sont mesurables avec des méthodes validées, les quantités de GSH présentes dans les lies et les DL sont souvent inconnues. Actuellement, on ne retrouve pas dans la littérature des méthodes spécifiques d'extraction et d'analyse du glutathion total dans les lies de vin. En revanche, le glutathion présent dans les dérivés de levures peut être quantifié par des méthodes colorimétriques utilisant une gamme étalon de glutathion pur. Toutefois, les méthodes rapportées dans la littérature varient considérablement, ce qui les rend souvent non comparables. Par conséquent, nous avons développé une méthode optimisée pour évaluer le potentiel GSH dans ces deux matrices levuriennes. Ensuite, le GSH et GSSG ont été dosés dans divers échantillons de lies et dérivés de levures. Les résultats présentés dans cet article technique sont la synthèse du travail publié récemment sur le journal *Food Chemistry*⁷.

Expérimentation

Une série de 23 échantillons de lies de vin blanc collectées auprès des propriétés vinicoles bordelaises a été utilisée pour l'étude. Elles ont été prélevées après fermentation alcoolique (après 1 semaine)

TABLE 1. Conditions optimales d'extraction du glutathion pour les lies de vin blanc et les dérivés de levures.

Echantillon	Ethanol (%)	Durée d'extraction (min)	Ratio solide-liquide (g/L)	GSH extrait
Lies (µg/g de lies)	0	105	10	4.30
Dérivés de levures-DL (mg/g de DL)	50	30	10	49.20

ou après élevage (6-12 mois) du vin. Les DL (15 échantillons) naturellement riches en composés réducteurs dont le GSH ont été fournis par des fabricants. Après extraction, les échantillons ont été lyophilisés, puis analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS). La méthodologie d'analyse chromatographique est décrite dans l'article originale de Winstel *et al.*⁷.

Développement de la méthode de quantification et extraction du GSH et du GSSG

Pour étudier la composition de matrices complexes comme les lies et les DL, des instruments puissants et fiables sont essentiels. La LC-HRMS est appropriée à la quantification du GSH grâce à sa large gamme dynamique et sa précision de mesure de masse.

Ainsi, après extraction du GSH des lies et DL, les conditions chromatographiques ont été optimisées pour améliorer la séparation du GSH et du GSSG et permettre leur quantification dans les deux matrices levuriennes.

Après le développement de la méthodologie d'analyse, l'extraction du GSH a été optimisée. Ainsi un plan d'expériences incluant le type de solvant, le temps d'extraction et le ratio solide-liquide a été effectué afin d'évaluer l'impact combiné de ces facteurs sur l'extraction du GSH. Les conditions optimales (Tableau 1) pour extraire la totalité du GSH ont été obtenues en utilisant une solution éthanol/eau à 50 %, à 10 g/L pendant 30 minutes pour les dérivés des levures et une solution d'eau 100 % ultrapure, à 10 g/L pendant 105 minutes pour les lies. Grâce à cette étude d'optimisation, il est alors possible de quantifier dans ces deux matrices le potentiel en GSH.

Quantification du GSH dans différents échantillons de lies de vin blanc

Des échantillons prélevés dans différentes caves, de différents cépages, différentes souches de levures, différents millésimes et du vin de goutte ou de presse, ont été analysés afin d'évaluer la gamme de concentrations de GSH et de GSSG que l'on peut trouver dans les lies suivant les pratiques œnologiques (Figure 1A et 1B). Comme le montre la Figure 1A, les concentrations variaient de 0,3 à 7,7 µg/g et de 0,3 à 34,4 µg/g pour le GSH et le GSSG, respectivement. Pour certaines lies (1 à 4 et 7), le GSH était présent à des concentrations plus élevées que le GSSG, tandis que l'inverse est observé pour les lies 5-6 et de 8 à 15. Une concentration plus élevée de GSSG pourrait s'expliquer par le fait que les lies n'étaient

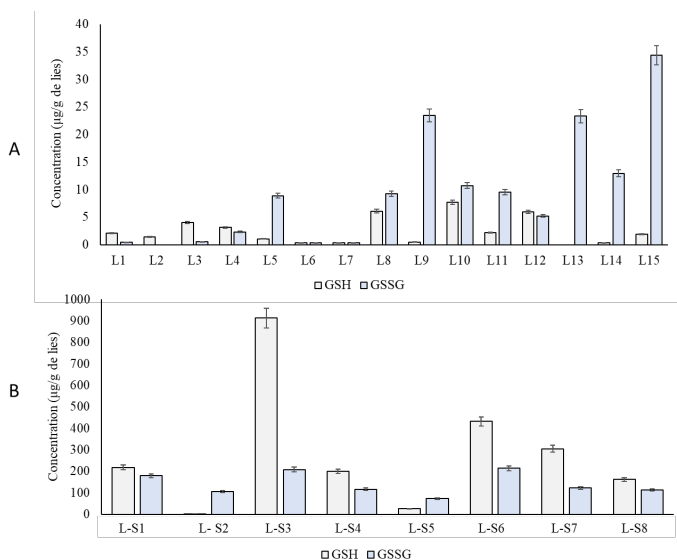


FIGURE 1. Concentration du GSH et du GSSG dans 15 lies (L1-L15, récupérés à la propriété 1 semaine après la fermentation alcoolique ou après 6 mois d'élevage) de vin blanc de différentes propriétés (Figure 1A) et 8 lies de la même propriété mais issues de fermentation alcoolique avec différentes souches de levure (S1-S8, récupérés 1 semaine après la fermentation alcoolique) (Figure 1B). Conditions d'extraction : lies dans l'eau à 10 g/L pendant 105 min.

pas protégées de l'oxydation (vinification sans SO_2). La sensibilité du glutathion à l'oxydation lors de la vinification a déjà été démontrée³ et la concentration finale de GSH dans les lies est donc dépendante des pratiques œnologiques.

Le GSH et le GSSG ont également été quantifiés dans des échantillons des lies du même vignoble et du même jus de raisin, mais vinifiés avec différentes souches de levure (Figure 1B). Des variations de concentrations ont été observées d'une lie à l'autre, allant de 0,8 à 913,5 µg/g et de 72,6 à 213,7 µg/g pour le GSH et le GSSG, respectivement (Figure 1B). Les lies prélevées dans le vin fermenté avec la souche de levure 3 contenaient la plus forte concentration de glutathion. Ces résultats montrent bien l'importance de choix de la levure de fermentation pour la préservation du GSH et notamment dans le cas d'une vinification sans sulfites.

Quantification du GSH dans différents dérivés de levures

Actuellement, l'analyse du GSH dans les dérivés de levures est réalisée principalement à l'aide de méthodes colorimétriques, la plus courante étant la méthode d'Ellman utilisant le réactif DTNB. Cette méthode permet de quantifier les groupes -SH, mais elle n'est pas spécifique au dosage du glutathion. C'est dans ce contexte que nous avons appliqué notre méthodologie pour le dosage du GSH aux dérivés de levures (DL). Quinze DL commerciaux de 6 marques différentes ont été analysés pour mesurer les concentrations de GSH et de GSSG (Figure 2). Les résultats ont montré que les deux molécules ont été détectées dans tous les échantillons, avec une valeur moyenne de 7,1 et 1,7 mg/g pour le GSH et le GSSG, respectivement. Les concentrations de GSH étaient significativement plus élevées que celles du GSSG, avec des valeurs allant jusqu'à 40 mg/g pour le GSH contre 5,1 mg/g pour le GSSG (Figure 2). En général, la teneur en glutathion de ces produits commerciaux est assez variable. Le dosage précis du GSH dans les DL s'avère alors indispensable pour orienter avec maîtrise leur utilisation suivant les itinéraires œnologiques et le type de vin souhaité.

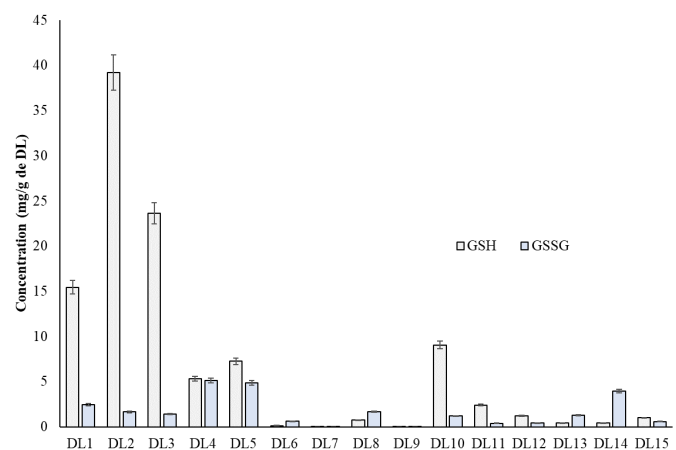


FIGURE 2. Concentration en GSH et GSSG dans 15 dérivés de levures commerciales. Conditions d'extraction optimisées : eau/éthanol 50 % et DL à 10 g/L pendant 30 mn.

Conclusion

Le présent travail propose une méthode optimisée pour extraire et quantifier le potentiel en glutathion dans les lies de vin blanc et les dérivés de levures. Cette méthodologie peut donc être applicable par les laboratoires d'analyses chimiques œnologiques équipés d'un appareil de chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse. Des méthodologies d'extraction et de quantification peuvent être d'intérêt pour le dosage du GSH et donc pour une gestion plus maîtrisée de l'élevage sur lies et l'utilisation des dérivés de levures en vinification, dans un contexte de préservation des niveaux de GSH. ■

Remerciements : Ce travail est supporté par l'ANR Valoli (ANR-21-CE43-0003) et la chaire Denis Dubourdieu. Nous tenons aussi à remercier les propriétés pour avoir fourni les lies ainsi que les entreprises de produits œnologiques pour les dérivés de levures.

1 Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2012). *Handbook of Enology Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 2). John Wiley & Sons, Ltd; Scopus.

2 Kritzing, E. C., Stander, M. A., & Du Toit, W. J. (2013). Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(1), 80–92. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.728723>

3 Pons, A., Lavigne, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2015). Glutathione Preservation during Winemaking with Vitis Vinifera White Varieties: Example of Sauvignon blanc Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(2), 187–194. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14053>

4 Lavigne, V., Pons, A., & Dubourdieu, D. (2007). Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1139(1), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.083>

5 Rigou, P., Mekoue, J., Sieczkowski, N., Doco, T., & Vernhet, A. (2021). Impact of industrial yeast derivative products on the modification of wine aroma compounds and sensorial profile. A review. *Food Chemistry*, 358, 129760. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129760>

6 Nioi, C., Lisanti, M. T., Meunier, F., Redon, P., Massot, A., & Moine, V. (2022). Antioxidant activity of yeast derivatives: Evaluation of their application to enhance the oxidative stability of white wine. *LWT*, 171, 114116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114116>

7 Winstel, D., Marchal, A., & Nioi, C. (2024). Optimization of extraction and development of an LC-HRMS method to quantify glutathione and glutathione disulfide in white wine lees and yeast derivatives. *Food Chemistry*, 439, 138121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138121>