

LES AMINES BIOGENES ET LA STABILITE BIOLOGIQUE DU VIN

Docteur Jürg Gafner

Microbiology and Molecular Biology in Winemaking, Federal Research Station for Fruit-Growing, Viticulture and Horticulture. CH-8820 Wädenswil, Suisse.

Résumé

La présence d'amines biogènes dans les vins n'est pas souhaitable, elle signale toujours la forte activité amino-décarboxylase de micro-organismes indésirables, comme les bactéries lactiques *Pediococcus damnosus*. En procédant à une observation au microscope pendant la vinification, il est possible de déceler l'apparition des bactéries *Pediococcus damnosus* et d'empêcher leur développement. L'ajout de cultures starter de bactéries *Oenococcus oeni* peut éviter ou retarder le développement de bactéries *Pediococcus damnosus*, et ainsi la formation d'amines biogènes. Les cultures starter de bactéries et/ou une observation au microscope pendant la vinification permettent à l'oenologue de prévenir la formation d'amines biogènes de manière simple, efficace et peu onéreuse.

Introduction

La formation d'histamine, une amine biogène, résulte de la décarboxylation de l'acide aminé histidine. De toutes les amines biogènes, l'histamine est la plus importante vis-à-vis de la santé humaine. Normalement, cette substance est éliminée sans problèmes après son ingestion par prise alimentaire. Néanmoins, le nombre de personnes réagissant par des symptômes graves à de faibles quantités d'amines biogènes présents dans les aliments est en augmentation. Ce type de maladie s'appelle « intolérance à l'histamine ». Les personnes atteintes de cette maladie sont soumises à des régimes alimentaires pauvres en histamine. Dans le vin, l'histamine est un contaminant indésirable. L'histamine est produite pendant la biosynthèse de protéines normales par l'homme, mais aussi par l'activité des bactéries. Les amines biogènes apparaissent en particulier pendant la fermentation et la maturation des aliments tels que le fromage, les légumes, les saucisses et le poisson, ainsi que des boissons alcoolisées (tableaux 1 et 2). Le taux d'histamine dépend essentiellement de la qualité de la gestion de la production. L'altération des aliments est également corrélée à un taux élevé d'histamine, qui est un bon marqueur de l'état de fraîcheur et de qualité (tableau 2). Les amines biogènes autres que l'histamine, telles que la putrescine, la tyramine, la cadavérine (etc.) se forment souvent pendant le traitement et la conservation des aliments. L'apparition parallèle de ces amines biogènes accroît la toxicité de l'histamine.

Tableau 1 : Aliments ayant le plus souvent des effets adverses (2) :

| |
|--|
| |
|--|

1. Boissons alcoolisées (vins rouges en particulier)
2. Fromages (fromages durs en particulier comme l'Emmental)
3. Chocolat
4. Salami et autres saucisses sèches
5. Noisettes
6. Tomates
7. Fraises, agrumes et autres libérateurs d'histamine
8. Choucroute
9. Epinards
10. Poisson

Tableau 2 : Taux d'histamine dans les principaux aliments où elle est présente.
Valeurs en mg/kg (sauf si indiqué différemment), comprises entre (max) (2).

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| Fromages | |
| Emmental | <10-500 (2 500) |
| Bergkaese | <10-1 200 |
| Parmesan | <10-580 |
| Gouda, Edam, Stangenkase | <10-200 (900) |
| Tilsiter, Geheimratskase, Butterkase | <10-60 |
| Fromages bleus d'Autriche | <10-80 |
| Camembert, Brie | <10-300 (600) |
| Schlosskase, Romadur | <10-100 |
| Quargel (fromage séché acide) | <10-50 (390) |
| Fromage blanc, fromage frais | 0 |
| Boissons alcoolisées (µg/kg) | |
| Vins rouges | jusqu'à 3 800 |
| Vins rouges d'Autriche | 60-600 (1 100) |
| Vins blancs d'Autriche | 10-120 |
| Vin pétillant | 15-80 |
| Champagne | 670 |
| Bière | 20-50 |
| Bière de froment (Weizenbier) | 120-300 |
| Bière sans alcool | 15-40 |
| Saucisses sèches/jambon | |
| Salami | <10-280 |
| Autres saucisses sèches | <10-100 |
| Osso collo, jambon Westfaeler | <10-300 |
| Viande fraîche | <1 |
| Poisson/produits de la mer | |
| Poisson frais | 0 |
| Poisson frais mal conservé | jusqu'à 13 000 |
| Produits congelés | 0-5 (>50) |
| Conserves (ex : thon) | 0-15 (300) |
| Légumes | |
| Tomate (ketchup) | 22 |
| Epinards | 30-60 |

| | |
|-------------------------|--------|
| Avocat | 23 |
| Aubergine | 26 |
| Choucroute | 10-200 |
| Vinaigre (µg/kg) | |
| Vinaigre de vin rouge | 4 000 |

Réactions d'intolérance à l'histamine

Actuellement, les effets médicaux de l'histamine sont bien connus. La plupart des personnes souffrant d'intolérance à l'histamine ont une activité diamine oxydase insuffisante, cette enzyme étant normalement présente chez tout individu. L'activité de cette enzyme transforme les amines biogènes comme l'histamine en substances non dangereuses. La réaction débute après avoir pris un repas riche en histamine. Les symptômes les plus graves sont : des rougeurs de la peau avec démangeaisons, des maux de tête, des nausées, des troubles digestifs, des diarrhées et des difficultés respiratoires. Il existe également des signes typiques d'allergie, tels que les yeux rouges et le nez qui coule. La capacité à éliminer l'histamine présente dans les aliments est sévèrement réduite chez tous les individus par la consommation d'alcool et les effets secondaires de certains médicaments. Ces deux facteurs inhibent l'enzyme diamine oxydase présente dans l'intestin humain et capable d'éliminer l'histamine ainsi que d'autres amines biogènes. Pour cette raison, la consommation associée de boissons alcoolisées (bière, vin, pétillant, spiritueux etc.) et d'aliments présentant des concentrations élevées d'amines biogènes doit être évitée. L'explication la plus récurrente à des taux élevés d'amines biogènes dans les aliments est la présence non désirée de bactéries d'altération ; celles-ci peuvent produire des amines biogènes comme l'histamine, lors des phases de traitement, de maturation et de conservation des aliments, contrôlées de façon insatisfaisante.

Prévention de la formation des amines biogènes dans les aliments

Les valeurs d'histamine tolérées dans les divers aliments sont établies par les normes Swiss Food Regulations. Pour le vin, la tolérance est de 10 mg/l. Pour que l'on considère qu'un vin ne comporte pas d'histamine, ce taux ne doit pas dépasser 0,5 mg/l. Il est bien connu que parmi les bactéries lactiques, on peut trouver des espèces et des souches capables de produire des taux quasiment nuls ou bien excessifs d'amines biogènes. Dans le vin en particulier, les souches de *Pediococcus damnosus* sont capables de produire des taux élevés d'histamine. L'industrie agro-alimentaire, ainsi que l'industrie vinicole, ont recours depuis peu à des cultures starter de bactéries aux propriétés définies, notamment en regard de la formation d'amines biogènes. L'inoculation à l'aide d'espèces et de souches de bactéries lactiques à faible capacité de production d'amines biogènes, réduit la formation de

ces amines pendant le traitement des aliments. Les amines biogènes (histamine) ne doivent pas apparaître du tout dans les vins. Au cours de la vinification, des micro-organismes recherchés et indésirables peuvent être présents. Les vinificateurs doivent s'assurer que les micro-organismes indésirables ne puissent pas se développer et contaminer le vin. En inoculant correctement des levures *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique, et des bactéries *Oenococcus oeni* lors de la fermentation malolactique, on peut faciliter beaucoup la production d'un vin sain et de bonne qualité. Le potentiel des cultures starter à produire des substances métaboliques non désirées est contrôlé minutieusement. Des recherches menées sur plusieurs années ont montré que l'ensemencement réussi de souches *Oenococcus oeni* pendant la vinification a empêché la formation d'amines biogènes (tableaux 3 et 4).

Tableau 3 : Taux d'amines biogènes dans les vins de Suisse orientale à partir de 1984 (3,5)

| | Valeurs moyennes en mg/l |
|---------------------|---|
| Amines biogènes | 151 pour les vins rouges / 51 pour les vins blancs (valeurs maximales) |
| Histamine | 2,0 (20) / 1,5 (10) |
| Tyramine | 2,8 (24,6) / 7,5 (43,8) |
| Phényl-2-éthylamine | 1,7 (9,4) / 1,7 (8,5) |
| Putrescine | 21,4 (200) / 11,1 (>100) |
| Isoamylamine | 8,2 (38,8) / 6,3 (17) |
| Cadavérine | 0,3 (1,2) / 0,1 (0,8) |

Les valeurs minimales et moyennes ont été obtenues lors du contrôle du processus de vinification – une vinification sans contrôle de la composition microbienne donne des valeurs maximales.

Tableau 4 : Taux d'histamine dans les vins lors de la fermentation malolactique – effets des cultures starter sur l'amélioration de la qualité du vin (4,5)

| Cultures starter <i>Oenococcus oeni</i> | Taux d'histamine en mg/l |
|---|--------------------------|
| Bitec | <1 |
| EQ 54 | <1 |
| Viniflora oenos "spontanée" | <1 |

Les autres amines biogènes également présents dans le vin et identifiés présentent tous respectivement un taux inférieur à <1 mg/l.

Garantir la sécurité et la qualité microbiologiques du vin

Afin de garantir la qualité d'un vin, il est très important d'en connaître la composition microbienne au cours de la production. Il existe des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) et des bactéries favorables (*Oenococcus oeni*), de même que des levures (*Hanseniaspora uvarum* et *Brettanomyces bruxellensis*) et des bactéries (*Pediococcus damnosus* et *Lactobacillus brevis*) indésirables. Notre système de test doit permettre de différencier les espèces qui viennent d'être citées, mais aussi les micro-organismes morts et vivants. Nous avons choisi des gènes « de ménage » pour les levures et les bactéries. Nous avons séquencé les gènes et défini les amorces pour la PCR. Le nombre total de cellules et le nombre de cellules défini quantitativement par la PCR quantitative sont statistiquement du même ordre. Dans les vins filtrés stériles, aucune des méthodes ne nous a permis de détecter des micro-organismes. Grâce à notre système, nous étions en mesure de différencier les espèces. Dans les vins présentant des taux élevés d'amines biogènes, nous avons toujours trouvé la bactérie *Pediococcus damnosus*. Dans la plupart des cas, la concentration d'amines biogènes produits et le nombre de cellules dénombrées sont en bonne corrélation. Dans de nombreux échantillons contenant la bactérie *Pediococcus damnosus*, les levures *Brettanomyces bruxellensis* ont également été décelées. Nous avons déjà observé ce phénomène lors d'études antérieures. Cependant, nous ne connaissons pas les interactions entre ces deux micro-organismes. Dans les échantillons de vin contenant les deux micro-organismes, nous avons trouvé des taux accrus d'amines biogènes (*Pediococcus damnosus*) ainsi que la fameuse saveur atypique liée aux *Brettanomyces* (*Brettanomyces bruxellensis* également appelée *Dekkera bruxellensis*). Les dégustateurs décrivent souvent cette saveur atypique (appelée caractère « brett » du terme *Brettanomyces*) comme médicinale, animale, métallique, épicée, de chaussette sale, de basse-cour et de pansement. Dans nos échantillons, nous avons pu voir que le nombre de cellules des levures *Brettanomyces* et l'intensité du caractère « brett » des vins sont en bonne corrélation. En outre, en mesurant l'éthyl-4 gaïacol et l'éthyl-4-phénol, les deux principales substances responsables du caractère « brett » dans nos échantillons, nous avons pu observer une bonne corrélation entre leur concentration et le nombre de cellules dénombrées : plus il y a de cellules se multiplient, plus les substances sont abondantes. Dans un chai, nous avons remarqué un développement du caractère « brett », à partir de la fin du mois de juillet 2002 jusqu'à la fin du mois de septembre 2002. Cet effet sensoriel est corrélé à la concentration des deux principales substances et à la multiplication au moins par cinq du nombre de cellules dans certains cas.

Jürg Gafner a étudié la biologie au Biocentre de l'université de Bâle en Suisse, de 1974 à 1982. Lors de son master et de ses travaux de thèse de doctorat, il s'est intéressé à la structure et aux fonctions du rétrotransposon Ty, mobile et récurrent de la levure à bourgeonnement Saccharomyces cerevisiae. A l'université de Düsseldorf en Allemagne, puis à l'université de Berne en Suisse, il a été assistant post-doctoral et dirigé une équipe de recherche, tout en continuant de mener des études sur la génétique de la levure Saccharomyces cerevisiae et sur les phénomènes de recombinaison anormale des levures Schizosaccharomyces pombe. A l'issue de ces premières années de recherche, le docteur Gafner a exercé au sein de la Station fédérale de recherche de Wädenswil en Suisse, en tant que chef d'une équipe de recherche sur la microbiologie et la biologie moléculaire. Il a mené des études sur la fermentation alcoolique et malolactique pendant la vinification. Les projets de son équipe de recherche sont ciblés sur les problèmes pratiques et constituent la base d'un programme intensif. Au cours des huit dernières années, les principaux thèmes de projets suivants ont été réalisés : levures produisant du dioxyde de soufre ; causes des arrêts de fermentation; méthodes pour terminer une fermentation lente ou bloquée ; fermentation malolactique ; utilisation de mélanges de levures pendant la vinification. Le docteur Gafner s'intéresse à l'écologie des microflores dans la vigne et pendant la vinification. De nouvelles recherches concerneront les produits métaboliques des micro-organismes et leur influence sensorielle sur le vin, en particulier dans le cadre d'une comparaison entre fermentation alcoolique et malolactique déclenchée et spontanée. L'équipe de recherche du docteur Gafner a sélectionné deux souches de levures commercialisées : la W46 pour les vins de cépage spécifique, et la W15 pour les vins donnant une production accrue de glycérol. Ces deux souches de levures se vendent bien sur le marché international, tout comme la W27, sélectionnée antérieurement par la Station fédérale de recherche de Wädenswil. Au cours du printemps 2002, le docteur Gafner est devenu professeur honoraire, à l'université Cornell de Genève, au sein du Département des sciences alimentaires.

Bibliographie

1. Bodmer S. und Gafner, J. Histamin in Wein. Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau, 21, 546-547, 2000.
2. Jarisch R. Histamine Intolerance (HTI) – an overlooked disease. COST 917 Biogenically active amines in food; Volume IV First general workshop; 30-35, 2000.
3. Mayer K. und Pause G. Amingehalte in Ostschweizer Weinen. Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau, 123, 303-309, 1987.
4. Hoffmann-Boller P., Oettli M., Egli C.M., Albisser S., Pulver D., Bill R., Henick-Kling T. and Gafner J. Impact of molecular biology on the study of the origin of biogenic amines in foods. COST 917 Biogenically active amines in food; Volume V; 72-75, 2001.
5. Gafner J. Biogenic amines in wine. Proceedings of the 13th International Enology Symposium in Montpellier / France, 95-106, 2002.