



*foods*



## Article

---

# Gestion de la Production du vin avec le cépage «Trebbiano Toscano» en amphore : Sélection de souches indigènes *Saccharomyces cerevisiae*, son influence sur le profil phénolique et sensoriel du vin

---

Simona Guerrini, Damiano Barbato, Silvia Mangani, Donatella Ganucci, Giacomo Buscioni, Viola Galli, Andrea Triossi and Lisa Granchi

## Affaire Spéciale

Contrôle qualité et surveillance des processus du raisin et du vin

Édité par  
Dr. Andrea Natolino



<https://doi.org/10.3390/foods12122372>

# Gestion de la Production du Vin du cépage «Trebbiano Toscano» en amphore : Sélection de souches indigènes *Saccharomyces cerevisiae*, son influence sur le profil phénolique et sensoriel du vin

Simona Guerrini <sup>1</sup>, Damiano Barbato <sup>1</sup>, Silvia Mangani <sup>1</sup>, Donatella Ganucci <sup>2</sup>, Giacomo Buscioni <sup>1</sup>, Viola Galli <sup>2,\*</sup>, Andrea Triossi <sup>3</sup> and Lisa Granchi <sup>2</sup>

<sup>1</sup> FoodMicroTeam s.r.l., Academic Spin-Off of the University of Florence, via Santo Spirito, 14-50125 Florence, Italy; simona@foodmicroteam.it (S.G.); damiano@foodmicroteam.it (D.B.); silvia@foodmicroteam.it (S.M.); giacomo@foodmicroteam.it (G.B.)

<sup>2</sup> Department of Agriculture, Food, Environment and Forestry (DAGRI), University of Florence, Via San Bonaventura, 13-50145 Florence, Italy; donatella.ganucci@unifi.it (D.G.); lisa.granchi@unifi.it (L.G.)

<sup>3</sup> DREAM Via Enrico Bindi, 14-51100 Pistoia, Italy; triossi@dream-italia.net

\* Correspondance: viola.galli@unifi.it

**Résumé:** L'utilisation d'amphores en terre cuite dans la vinification peut conférer aux vins des attributs uniques qui renforcent leur typicité. Par conséquent, dans cette étude, les fermentations spontanées et inoculées en amphore du moût de raisin Trebbiano Toscano ont été suivies pour évaluer les souches de *Saccharomyces cerevisiae* présentes dans chaque fermentation et déterminer ainsi les caractéristiques chimiques des vins. Le type des souches par des analyses Interdelta a montré que les starters commerciaux ne dominaient pas, avec des pourcentages d'implantation de 24% et 13%, et que 20 souches indigènes étaient présentes à des pourcentages différents, allant de 2 à 20%, dans les fermentations inoculées et spontanées. L'évaluation des caractéristiques techniques des souches indigènes par le biais de fermentations en laboratoire et à l'échelle pilote (amphores de 20 L) et l'analyse sensorielle des vins expérimentaux ont permis de sélectionner deux souches indigènes à utiliser comme cultures de départ par rapport à une souche commerciale dans des vinifications de 300 L-amphore en cave. Les performances fermentaires observées et l'analyse sensorielle des vins expérimentaux ont montré qu'une souche indigène de *S. cerevisiae* dominait dans le processus et conférait des caractéristiques sensorielles distinctives au vin Trebbiano Toscano, démontrant son efficacité dans la gestion des fermentations en amphore. En outre, les résultats ont démontré la capacité des amphores à protéger les composés polyphénoliques de l'oxydation pendant le vieillissement du vin. En effet, la concentration des acides hydroxycinnamiques et des flavonols a diminué, avec une réduction moyenne de 30 % et 14 %, respectivement, tandis que les acides hydroxybenzoïques sont restés inchangés.

**Mots-clés:** amphores ; souches de levure indigènes ; *Saccharomyces cerevisiae* ; fermentation alcoolique ; vin ; polyphénols ; Trebbiano Toscano



**Citation:** Guerrini, S.; Barbato, D.; Mangani, S.; Ganucci, D.; Buscioni, G.; Galli, V.; Triossi, A.; Granchi, L. Management of in-Amphora “Trebbiano Toscano” Wine Production: Selection of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains and Influence on the Phenolic and Sensory Profile. *Foods* **2023**, *12*, 2372. <https://doi.org/10.3390/foods12122372>

Rédacteur Academic: Andrea Natolino

Reçu: 11 May 2023

Révisé: 8 June 2023

Accepté: 12 June 2023

Publié: 14 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

La vinification traditionnelle en amphores est l'une des plus anciennes méthodes de production de vin connues [1]. Récemment, les récipients en terre cuite ou en faïence ont suscité un regain d'intérêt en tant que contenants pour la fermentation et le vieillissement du vin, car ils peuvent conférer aux vins des attributs uniques qui renforcent leur typicité [2]. En outre, les récipients en terre cuite peuvent être produits en petits volumes, ce qui permet de produire des vins en utilisant de petits lots de raisins sélectionnés et de qualité ouvrant ainsi un champ d'opportunités économiques aux petits producteurs de vin [1,3,4]. En raison de ce nouvel intérêt commercial, certains cépages ont été testés pour la production de vins en amphore. Il s'agit de raisins blancs comme le Sauvignon, le Chardonnay, le Riesling, le Grecanico, le Falanghina, ou de raisins rouges comme le Grenache, le Gamay, l'Aglianico, le Nero d'Avola, le Frappato, le Teroldego [5]. Toutefois, la plupart de ces études portent sur les caractéristiques physicochimiques et sensorielles des vins vieillissés en amphores [5–8], tandis que quelques-unes seulement se préoccupent de leur écologie microbienne [1,9].

Les études sur les aspects physico-chimiques des vins produits en amphores mettent en évidence les différences avec les vins élevés dans des contenants de différents matériaux, en particulier l'acier. En effet, alors que l'acier inoxydable est un matériau inerte et restreint les échanges gazeux, les amphores en terre sont poreuses [5]. La porosité de la faïence permet à l'oxygène de pénétrer, ce qui entraîne une oxygénation lente du vin, semblable à celle qui se produit dans les barriques en bois. [1]. Cependant, cette affirmation ne peut être généralisée car elle est tributaire des conditions de production des amphores, comme le rapportent Seo et al. [10]. En outre, la littérature scientifique ne contient que très peu de données sur le taux de transmission de l'oxygène à travers les tonneaux en bois et presque aucune sur les récipients en terre cuite. [5]. Quoi qu'il en soit, les différences entre les vins vieillies en acier, en bois ou en terre semblent être principalement liées aux composants polyphénoliques et aromatiques du vin. [11]. Les différentes concentrations d'oxygène pendant la vinification peuvent également influencer le taux de fermentation alcoolique et la concentration des différents composés produits par les levures, principalement les esters, les alcools supérieurs, les acides gras à chaîne moyenne, les acides ramifiés, les aldéhydes et les cétones. [12–14]. Par conséquent, l'utilisation d'amphores pourrait avoir un impact significatif sur le métabolisme des levures et, en particulier, de *Saccharomyces cerevisiae*, la levure principalement responsable de la fermentation alcoolique dans le vin. À notre connaissance, il existe peu d'informations dans la littérature scientifique sur l'impact des amphores sur la dynamique de la fermentation alcoolique. [1]; En outre, aucune étude n'a été menée pour examiner l'efficacité des levures commerciales de démarrage ou la biodiversité de *S. cerevisiae* dans les fermentations spontanées du vin réalisées dans ces récipients. En général, au cours de la fermentation spontanée du vin, le développement de différentes souches indigènes de *S. cerevisiae* a été largement démontré, et cette biodiversité joue un rôle actif dans la définition des caractéristiques sensorielles du produit final [9,15–17]. En outre, les souches indigènes de *S. cerevisiae* pourraient être mieux adaptées que les standards commerciaux à des conditions fermentaires particulières [18–21]. Cela pourrait être particulièrement vrai pour les fermentations de vin réalisées en amphores, car les standards commerciaux ont généralement été sélectionnés pour des fermentations réalisées dans des cuves en acier ou en béton. La sélection adéquate des souches indigènes de *S. cerevisiae* pourrait également contribuer à la production de vins caractérisés par un saveur et un arôme plus distinctifs. [22], en fonction de la contribution de l'utilisation de l'amphore au produit final. Ceci est particulièrement intéressant pour les cépages, tels que le Toscano Trebbiano, qui est l'un des cépage blanc les plus répandus en Italie en raison de sa grande adaptabilité aux différents types de sols et de conditions climatiques [23]. Bien que les vins qui en résultent soient généralement agréables et corrects, ils se caractérisent souvent par un profil neutre [24]. L'utilisation d'amphores, en association avec des souches autochtones sélectionnées de manière appropriée, pourrait contribuer à la production de vins au profil sensoriel plus marqué et donc plus reconnaissable. Pour optimiser le processus de production de vin dans des amphores en terre cuite, la première étape consiste à connaître les effets de ce type de récipient sur les processus de fermentation et de vieillissement du vin d'un point de vue microbiologique et chimique. L'objectif de cette étude était donc double : (1) évaluer la possibilité de sélectionner des souches indigènes de *S. cerevisiae* pour la gestion de la fermentation alcoolique dans les amphores en contrôlant certaines fermentations spontanées et inoculées ; (2) étudier l'impact des amphores en terre cuite sur le profil phénolique du vin obtenu à partir de raisins blancs du cultivar Trebbiano Toscano.

## 2. Matériels et Méthodes

Le schéma expérimental de la recherche est présenté dans la figure S1.

### 2.1. Fermentations en cave pour isoler les levures indigènes *S. cerevisiae*

Six fermentations alcooliques ont été réalisées dans des amphores en terre cuite de 300 litres (fabriquées à Impruneta, Toscane, Italie) qui n'avaient pas été utilisées auparavant. Les amphores 1 et 2 ont été inoculées à  $2 \times 10^6$  cellules/mL avec le starter commercial Anchor VIN13, et les amphores 3 et 4 aux mêmes concentrations cellulaires avec le starter commercial Aroma White Enartis, tandis que les amphores 5 et 6 ont été laissées en fermentation spontanée. Ces amphores étaient ovales, avec une forme qui favorisait les mouvements internes habituels du vin, et se caractérisaient par une épaisseur uniforme de 2,5 cm dans toutes les parties en contact avec le vin, avec une double couche interne de terre cuite. La fermeture des amphores était constituée d'un système de terre cuite qui garantissait l'étanchéité du récipient, excluant l'utilisation de résines et d'acier. Les amphores ont été placées dans une zone spécifique d'une cave

toscane. Les raisins de la variété Trebbiano Toscano ont été récoltés lors de la vendange 2021 et le jus de raisin obtenu a été utilisé pour les fermentations expérimentales en cave. La composition du jus de raisin était la suivante : glucose, 91 g/L ; fructose, 97 g/L ; acide malique, 2,98 g/L ; azote total, 127 mg/L ; SO<sub>2</sub> total, 25 mg/L ; pH 3,31. Le goût de raisin était caractérisé par des levures non-Saccharomyces à des concentrations inférieures à 100 UFC/mL, des bactéries lactiques à 1,0 × 10<sup>3</sup> UFC/mL, de la nitro-base 6,7 g/L ; de l'acide p-coumarique, 100 mg/L ; du cycloheximide, 10 mg/L ; de l'éthanol, 6 % v/v ; du vert de bromocrésol, 22 mg/L ; de la gélose, 20 g/L). Les fermentations ont été contrôlées au moyen d'analyses microbiologiques et chimiques, comme indiqué ci-dessous. L'oxygène dissous et la température ont été contrôlés (intervalles de détection toutes les 5 minutes) dans chaque amphore à l'aide de capteurs Oxilevel Dos 225 commercialisés par Parsec Srl (Florence, Italie).

## 2.2. Analyse Microbiologique

Les levures ont été isolées à quatre moments différents des diverses fermentations alcooliques à partir des plaques de milieu WL Nutrient Agar. Après purification des colonies par stries successives, les levures ont été cultivées sur un milieu YPD à 1% (p/v) de levures et de bactéries d'acide acétique à 1.3 × 10<sup>3</sup> CFU/mL. Lors des fermentations alcooliques, les levures ont été quantifiées sur milieu WL Nutrient Agar, et les plaques ont été incubées pendant 48 h à 30°C en conditions aérobies. Les bactéries lactiques ont été quantifiées sur milieu MRS Agar et incubées pendant cinq jours à 30 °C dans des conditions d'anaérobiose et les bactéries acétiques ont été quantifiées sur milieu Lafon-Lafourcade à 30 °C dans des conditions aérobies, *Brettanomyces bruxellensis* a été quantifiée sur milieu DBDM (Dekkera/Brettanomyces Differential Medium ).

## 2.3. Identification et sélection des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

Près de 500 isolats de levure ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* par l'amplification du gène de l'ARNr 5.8S et des deux espaces transcrits internes ribosomiques, comme décrit par Granchi et al. [25]. Tous ces isolats ont également été caractérisés au niveau de la souche par typage PCR inter- $\delta$ , comme l'ont rapporté Legras et Karst [26], avec  $\delta_{12}/\delta_{21}$  paire de départ [26]. Pour distinguer les souches indigènes de *S. cerevisiae*, les starters commerciaux suivants couramment utilisés en cave ont également été analysés : EnartisFerm, Aroma White, EnartisFerm TT EnartisFerm D20 (Enartis, Trecate, Novara, Italie) ; VIN 13, Alchemy I (Anchor Oenology Cape Town, Afrique du Sud) ; Fermivin PDM (Corimpex service s.r.l. Romans d'Isongo, Gorizia, Italie) ; Zymaflore X16, Zymaflore F83 ; Zymaflore F15, Zymaflore FX 10, Zymaflore RB4, Actiflore D-ONE (Laffort, Bordeaux, France) ; Viw smart, Viw Fresh, Viw fruité, Viw intelligent, (Enologica Vason S.p.A. S.Pietro à Cariano, Vérone, Italie). Les modèles génomiques ont été soumis pour comparaison par paires à l'aide du coefficient de dés et de l'analyse groupée avec la méthode des groupes de paires non pondérés. La diversité de *S. cerevisiae* dans chaque fermentation a été quantifiée en utilisant les deux indices « H » et « e » [27].

## 2.4. Détermination technologique des souches de *S. cerevisiae*

Les caractéristiques techniques, notamment la capacité à produire du sulfure d'hydrogène, l'activité  $\beta$ -glucosidase et l'activité protéase, ont été étudiées au préalable afin de sélectionner des souches indigènes de *S. cerevisiae* présentant des caractéristiques œnologiques appropriées pour la production de vin.

### 2.4.1. Tests d'activité des tueurs

Les tests d'activité tueuse ont été réalisés conformément à Philliskirk et Young [28]. La souche sensible de référence *S. cerevisiae* (NCYC 1006 ; National Collection of Yeast Cultures, Norwich, UK) et la souche tueuse de référence *S. cerevisiae* NCYC 738 (National Collection of Yeast Cultures, Norwich, UK) ont été utilisées.

#### 2.4.2. Production de sulfure d'hydrogène

La capacité à produire du sulfure d'hydrogène a été estimée, comme l'ont rapporté Aponte et al. [29], sur plaques de gélose BIGGY. Après 72 h d'incubation à 26 °C, la production de H<sub>2</sub>S a été estimée via le noircissement des colonies après 3 jours d'incubation à 28 °C, en utilisant une échelle à cinq niveaux allant de 0 (blanc) à 5 (noir)

#### 2.4.3. Activité β-glucosidase

Les tests d'activité β-glucosidase ont été réalisés selon Hernández et al. [30] sur un milieu Agar esculine, pH 5. Une seule colonie a été étalée sur la surface de la plaque et a été incubée à 48-72 h. Les souches possédant une activité β-glucosidase ont produit une coloration brune. incubée à 30°C pendant 48-72 h. Les souches possédant une activité β-glucosidase ont produit un halo brun autour de la strie. Une échelle à cinq niveaux a été utilisée, de 0 (pas de halo) à 5 (halo brun foncé).

#### 2.4.4. Activité protéasique

L'activité protéasique a été dosée sur des plaques de gélose au lait écrémé (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). Les plaques ont été inoculées avec des cultures de levures fraîches et incubées à 26°C pendant 3 jours. Des halos clairs autour des stries de levure indiquaient une activité protéolytique [31].

#### 2.4.5. Capacité de fermentation

Les souches sélectionnées ont été testées pour leur capacité fermentaire sur le moût de raisin Trebbiano, qui a été obtenu à partir de la récolte 2021 et stocké congelé à -20°C jusqu'à son utilisation. Ensuite, des flacons Erlenmeyer de 250 ml, fermés par une valve Müller et contenant 160 ml de moût de raisin, ont été inoculés avec les souches indigènes pour obtenir une concentration cellulaire initiale d'environ  $2 \times 10^6$  CFU/ml et incubés à 25°C. Les fermentations ont été contrôlées quotidiennement, en enregistrant la perte de poids jusqu'à la fin de la fermentation. [22]. Les fermentations ont été effectuées en double. Le taux de croissance spécifique  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) de chaque souche testée a été calculé en interpolant les données à la fonction de Gompertz. Les substrats et les produits du métabolisme principal des levures ont été détectés à la fin des fermentations par HPLC, comme indiqué ci-dessous.

#### 2.5. Fermentations à l'échelle du laboratoire

Sur la base des résultats obtenus lors du criblage préliminaire, les souches de *S. cerevisiae* sélectionnées ont été inoculées à  $2 \times 10^6$  cellules/mL en tant que cultures axéniques dans des amphores de 20 L (fabriquées à Impruneta, en Toscane, Italie) contenant 15 L de moût de raisin Trebbiano Toscano obtenu à partir des raisins récoltés lors de la vendange 2021. La composition physico-chimique du moût de raisin était la suivante : glucose, 90 g/L ; fructose, 84 g/L ; acide malique, 1,10 g/L ; acidité totale, 5,2 g/L ; azote total, 121 mg/L ; SO<sub>2</sub> total, 20 mg/L ; pH 3,26. Les fermentations ont été conduites dans une cave expérimentale et suivies par HPLC pour déterminer les principaux métabolites microbiens. A la fin des fermentations, les levures, les bactéries lactiques et les bactéries acétiques ont été quantifiées, comme indiqué ci-dessus. Un nombre significatif de colonies cultivées sur le milieu WL a été prélevé au hasard dans chaque vin et soumis à une analyse des régions inter-δ afin d'évaluer si les souches de levure inoculées étaient responsables de la fermentation alcoolique. À la fin des fermentations alcoolique et malolactique, les vins ont été stabilisés à 4 °C et à 5 °C. Les vins ont été soumis à une analyse de régions inter-δ. Les vins ont été stabilisés à 4°C, puis transférés dans des bouteilles en verre et placés à 18°C.

#### 2.6. Fermentations en Cave

Les raisins de la variété Trebbiano Toscano ont été récoltés lors de la vendange 2022, et le jus de raisin obtenu a été utilisé pour l'expérimentation dans la cave. Les souches indigènes de *S. cerevisiae* sélectionnées ont été inoculées sous forme de cultures axéniques (amphore A, concentration initiale de  $5.0 \times 10^6$  CFU/mL) ou ensemble (amphore B, concentration initiale de  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL) dans des amphores de 300 L contenant du moût de raisin Trebbiano Toscano (pH : 3,73). Une souche de départ commerciale a également été inoculée dans les mêmes conditions à titre de comparaison

(Amphore C). La composition chimique du jus de raisin était la suivante : glucose, 83 g/L; fructose, 98 g/L ; acide malique, 1,66 g/L ; acide acétique, 0,06 g/L ; azote total, 136mg/L; SO<sub>2</sub> total, 25 mg/L. Au moment de l'inoculation, le moût de raisin contenait  $1.60 \times 10^6$  CFU/mL de levures non-*Saccharomyces* et des concentrations de bactéries lactiques et acétiques inférieures à la limite de détection. Les fermentations ont fait l'objet d'un suivi chimique et microbiologique, comme indiqué ci-dessus. À la fin des fermentations alcoolique et malolactique spontanée, les vins ont été mis en bouteille et soumis à une analyse sensorielle après trois semaines.

### 2.7. Analyse Chimique

Les teneurs en glucose, fructose, éthanol, glycérol, 2,3-butanediol, acides acétique, lactique et succinique du moût et du vin ont été déterminées par HPLC, conformément à Guerrini et al. [32], en utilisant une colonne Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (particules de 8 µm, 300 × 7,8 mm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) et un chromatographe ProStar 210 équipé d'un DAD à 210 nm et d'un détecteur d'indice de réfraction, en série (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). La concentration en acide malique a été déterminée par voie enzymatique à l'aide d'un analyseur multiparamétrique automatique (Hyperlab, Steroglass, San Martino, Italie).

### 2.8. Détermination des composés phénoliques

Pour la détermination des acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique, des flavonols, des flavan-3-ols, des stilbènes et des alcools phénoliques, les vins ont été filtrés (0,45 µm) et injectés dans la HPLC-UV/FLD Jasco série 4000 (Jasco, Japan Spectroscopic co, Hachioji City, Japan) équipée d'une pompe PU-4180, d'un passeur d'échantillons AS-4050, d'un détecteur à barrettes de photodiodes MD-4010, d'un four à colonne CO4060 et d'une colonne en phase inversée NovaPak C18 (particules de 4 µm, 300 × 3,9 mm ; Waters, Milford, MA, USA), thermostatée à 25°C. La phase mobile était (A) 2% (v/v) d'acide acétique dans l'eau et (B) d'acétonitrile. Le profil du gradient était le suivant : 0-40 min, 1-20% B ; 40-45 min, 20-50% B ; et 45-55 min, 50-95% B, suivi d'un lavage à l'acétonitrile et d'un rééquilibrage de la colonne de 65 à 85 min ; le débit était de 0,9 mL/min du début à 35 min et de 1,0 mL/min de ce point jusqu'à la fin. Les composés phénoliques ont été détectés par balayage de 210 à 600 nm. Les acides hydroxybenzoïques ont été quantifiés à 280 nm en utilisant les acides gallique, protocatéchuïque, vanillique et syringique comme étalons (Merck Life Science, Milano, Italie) ; le méthylgallate et l'éthylgallate ont été exprimés en équivalents d'acide gallique. Les acides hydroxycinnamiques ont été quantifiés à 280 nm en utilisant les acides caféique, trans-p-coumarique et férulique comme étalons (Merck Life Science, Milano, Italie) ; l'acide férulique a été exprimé en équivalents d'acide férulique, l'acide trans-caféique en équivalents d'acide caféique, les acides trans-p-coumarique et cis-p-coumarique en équivalents d'acide trans-p-coumarique. Les stilbènes ont été quantifiés à 280 nm en utilisant le trans-resvératrol et le cis-resvératrol comme étalons (Merck Life Science, Milano, Italie) ; le trans-piceid et le cis-piceid ont été exprimés en équivalents de trans-resvératrol et de cis-resvératrol. Les flavan-3-ols ont été quantifiés à 280 nm en utilisant la catéchine et l'épicatéchine comme étalons (Merck Life Science, Milano, Italie) ; l'épicatéchine-3-O-gallate a été exprimée en équivalents d'épicatéchine. Les flavonols ont été quantifiés à 360 nm en utilisant la quercétine, la myricétine, le kaempférol, la quercétine-3-O-glucoside, la quercétine-3-O-glucuronide, la quercétine-3-O-galactoside, le kaempférol-3-O-glucoside (Merck Life Science, Milano, Italie), la myricétine-3-O-glucoside et la myricétine-3-O-galactoside (Extrasynthèse, Cedex, France) comme étalons. Les alcools phénoliques ont été quantifiés à 280 nm en utilisant le tyrosol et le tryptophol comme étalons (Merck Life Science, Milano, Italie) ; l'hydroxytyrosol a été exprimé en équivalents tyrosol. Les phénols volatils (4-vinyl-phénol, 4-vinylguaïacol, 4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol) ont été déterminés par HPLC-UV/FLD Jasco série 4000 (Jasco, Japan Spectroscopic co, Hachioji city, Japan) équipée d'une pompe PU-4180, d'un passeur automatique d'échantillons AS-4050, d'un détecteur à matrice de photodiodes MD-4010 à 280 nm, d'un détecteur de fluorescence FP-4025 (λexc 260/λems 305), d'un four à colonne CO4060 et d'une colonne à phase inversée Kinetex (particule de 5 µm, 150 × 4.6 mm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA), et un thermostat à 25 C. La phase mobile était (A) 0,1 % (v/v) d'acide phosphorique dans de l'eau et (B) de l'acétonitrile ; le profil du gradient était 0-25 min, 10-90% B ; 25-30 min, 90-10% B, suivi de 15 min de rééquilibrage de la colonne ; le débit était de 1,0 mL/min.

### 2.9. Détermination des amines biogènes

Les amines biogènes (agmatine, éthanolamine, phényléthylamine, cadavérine, histamine, tyramine, spermine et spermidine) ont été quantifiées en tant que dérivés de la demoiselle, comme décrit par Tuberoso et al. [33], en utilisant l'heptylamine comme étalon interne. La détermination a été effectuée à l'aide d'une HPLC- UV/FLD Jasco série 4000 (Jasco, Japan Spectroscopic co, Hachioji city, Japan) équipée d'une pompe PU-4180, d'un échantillonneur automatique AS-4050, d'un détecteur à réseau de photodiodes MD-4010, d'un détecteur de fluorescence FP-4025 et d'un four à colonne CO4060 équipé d'une colonne Gemini® C18 de 150 mm × 4,6 mm × 5 µm (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) protégée par une cartouche SecurityGuard® C18. La quantification a été réalisée à l'aide de courbes d'étalonnage obtenues selon la méthode de l'étalon interne, qui permet de corrélérer le rapport entre la surface du pic de l'analyte et de l'étalon interne et la concentration. Les étalons d'amines biogènes, l'heptylamine et le chlorure de dansyle proviennent de Merck (Merck Life Science, Milano, Italie).

### 2.10. Analyse Sensorielle

L'analyse sensorielle des vins produits en amphores de 300 litres et de 20 litres a été réalisée strictement selon les méthodes décrites dans la résolution OIV/CONCOURS 332A-2009. [34]. Quinze dégustateurs ont été recrutés et les descripteurs utilisés sont la droiture olfactive, l'intensité olfactive, la qualité olfactive, la droiture gustative, l'intensité gustative, la qualité gustative, la persistance gustative et l'impression générale. Les résultats ont été évalués sur une échelle de 5 points.

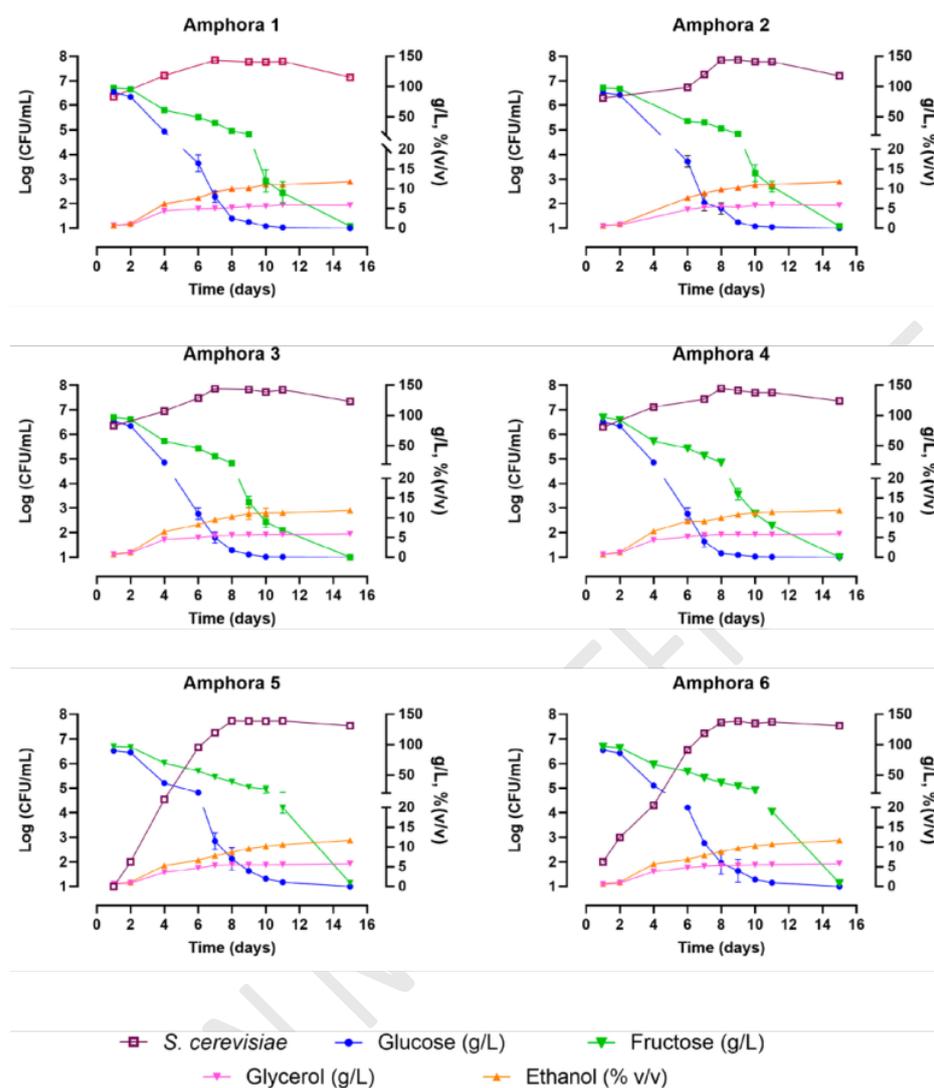
### 2.11. Analyse Statistique

Les déterminations analytiques, effectuées en double, ont été élaborées selon une ANOVA non paramétrique suivie du test de Tukey. Les différences ont été signalées à un niveau de signification de  $p < 0.05$  ou  $p < 0.01$ . L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour classer les attributs sensoriels des vins. Les données relatives aux caractéristiques technologiques de *S. cerevisiae* ont été élaborées à l'aide d'une analyse hiérarchique par grappes (méthode des groupes de paires non pondérées, UPMGA) en utilisant le coefficient de Pearson. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica 7.0 (Stasoft GmbH, Hambourg, Allemagne). Les motifs génomiques ont été analysés en vue d'une comparaison par paire à l'aide du coefficient de Dice et d'une analyse en grappes à l'aide de la méthode UPGMA via le logiciel Gel Compare 4.0 (Applied Math, Kortrijk, Belgique).

## 3. Les Résultats

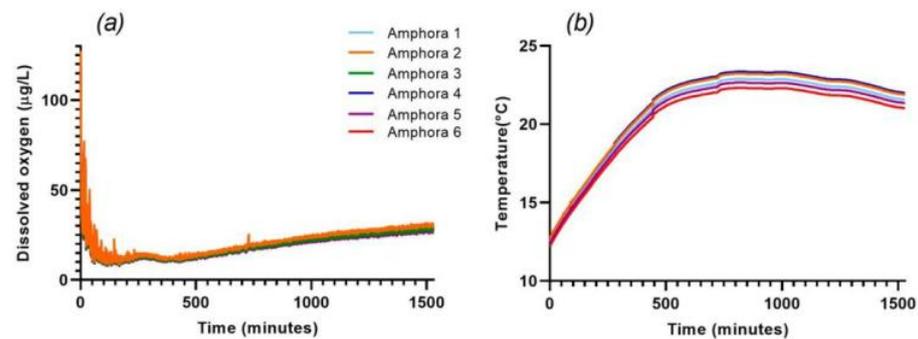
### 3.1. Cinétique de la fermentation alcoolique dans des amphores de 300 litres

Les raisins de la variété Trebbiano Toscano ont été récoltés lors de la vendange 2021, foulés et répartis dans six amphores situées dans une cave et équipées de sondes de contrôle de l'oxygène dissous et de la température. Les amphores 1 et 2 ont été inoculées avec le starter commercial Anchor VIN13, les amphores 3 et 4 avec le starter commercial Aroma White Enartis, tandis que les amphores 5 et 6 ont été laissées en fermentation spontanée. Les paramètres chimiques des fermentations alcooliques et la cinétique de croissance des populations de *S. cerevisiae* obtenues dans chaque amphore sont présentés dans la Figure 1. Les populations de levures non-Saccharomyces et de bactéries acétiques et lactiques étaient présentes à des valeurs négligeables ( $<10^3$  CFU/mL) au cours des deux premiers jours de toutes les fermentations testées et a ensuite diminué pour atteindre des valeurs inférieures à la limite de détection ( $<10$  CFU/mL). Dans toutes les fermentations, le glucose et le fructose ont été dégradés en près de deux semaines, produisant environ 12 % de glucose et de fructose (*v/v*) d'éthanol et d'acide acétique inférieure à 0,3 g/L. Les deux fermentations spontanées (amphores 5 et 6) ont montré une évolution régulière des fermentations avec la croissance de la population de *S. cerevisiae* qui a atteint une concentration de l'ordre de  $6 \times 10^7$  CFU/mL en sept jours. Le déroulement régulier de ces fermentations spontanées suggère la possibilité d'utiliser les souches indigènes sélectionnées appartenant à l'espèce *S. cerevisiae* avec des caractéristiques de croissance adaptées à la production de vins en amphore.



**Figure 1.** Paramètres chimiques et cinétique de croissance de *S. cerevisiae* dans les fermentations vinicoles réalisées dans des amphores de 300 L. Les amphores 1 et 2 ont été inoculées avec le starter commercial Anchor VIN13. Les amphores 1 et 2 ont été inoculées avec le starter commercial Anchor VIN13, les amphores 3 et 4 avec le starter commercial Aroma White Enartis, et les amphores 5 et 6 ont été laissées en fermentation spontanée.

Le contrôle de l'oxygène dissous et de la température pendant la fermentation alcoolique au cours des premières 24 heures a montré des tendances similaires dans toutes les amphores (Figure 2). Pendant les quatre premiers jours de la fermentation, et après une période nécessaire à l'homogénéisation du moût et à la stabilisation des sondes, l'oxygène dissous se situait entre 10 et 15  $\mu\text{g/L}$ . Par la suite, ce paramètre a augmenté progressivement jusqu'à atteindre des valeurs entre 20 et 25  $\mu\text{g/L}$  à la fin de la fermentation alcoolique. Par la suite, ce paramètre a augmenté progressivement jusqu'à atteindre des valeurs comprises entre 20 et 25  $\mu\text{g/L}$  à la fin de la fermentation alcoolique, probablement en raison du pigeage quasi quotidien des vins. En ce qui concerne l'évolution de la température, toutes les amphores ont montré une augmentation rapide, vers le troisième jour de fermentation, jusqu'à des valeurs comprises entre 22 et 24°C environ, et les jours suivants, elles sont restées à des valeurs comprises entre 22 et 20°C. Ces valeurs de température ont démontré la capacité optimale des amphores à maintenir le moût en fermentation à des températures appropriées pour la physiologie de *S. cerevisiae*.



**Figure 2.** Oxygène dissous (a) et température (b) des 24 premières heures des six fermentations alcooliques réalisées en amphores.

### 3.2. Caractéristiques chimiques et microbiennes des vins au cours de leur vieillissement dans des amphores de 300 litres

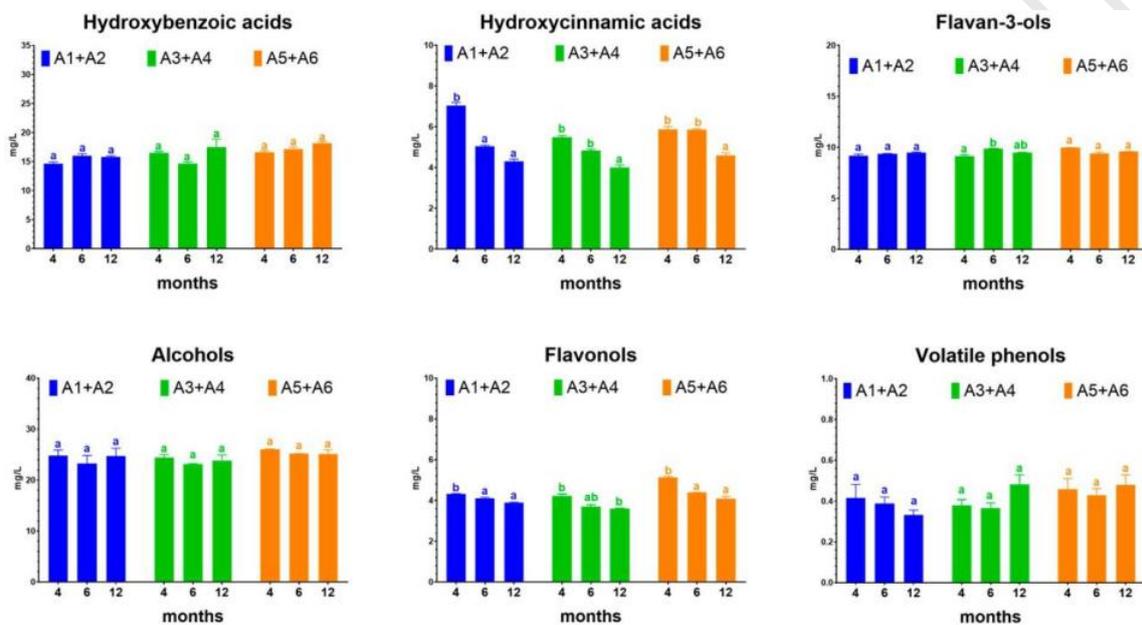
Après la fin des fermentations alcooliques et malolactiques, les vins de chaque amphore ont été soutirés pour éliminer les lies et remis dans les amphores propres pour démarrer l'élevage. Les amphores étant remplies de moût de raisin à 80% de leur capacité, alors que l'élevage devait s'effectuer dans des récipients pleins, les amphores ont été remplies comme suit : les vins obtenus avec le levain Anchor VIN13 ont été rassemblés dans la première amphore (échantillon codé A1+2); les vins obtenus avec le levain Aroma white Enartis dans la deuxième amphore (échantillon codé A3+4) et les vins obtenus par fermentation spontanée dans la troisième amphore (échantillon codé A5+6). Ainsi, les vins obtenus ont été suivis via des analyses physico-chimiques et microbiologiques à 4, 6 et 12 mois d'élevage en amphores. Pendant ce temps, la teneur en oxygène des différentes amphores est toujours restée à de faibles niveaux, précisément en dessous de 50 µg/L.

Concernant l'évolution des principaux paramètres œnologiques au cours de l'élevage, les vins des différentes amphores ont montré des tendances très similaires (Tableau 1): les concentrations de sucres, d'éthanol, de glycérol et d'acide lactique n'étaient pas affectées, tandis que l'acide acétique augmentait, même s'il restait inférieur au seuil de perception sensorielle (1 g/L). Des similitudes entre les trois amphores ont également été constatées en ce qui concerne les aspects microbiologiques (Tableau 1): *S. cerevisiae* et *Oenococcus oeni* les populations ont progressivement diminué au cours du vieillissement jusqu'en dessous de la limite de détection, tandis que les levures *Brettanomyces bruxellensis* ont été trouvées après 4 mois de vieillissement. Pour éviter le risque de croissance ultérieure de cette levure d'altération, des sulfites ont été ajoutés (50 mg/L de SO<sub>2</sub>). Cette opération a conduit au fil du temps à ce que la population de *Brettanomyces* soit inférieure à la limite de détection lors des prélèvements ultérieurs. Enfin, toutes les vinifications réalisées en amphores ont montré la dégradation complète de l'acide malique quelques jours plus tard, fin de fermentation alcoolique, comme le montre la concentration en acide lactique (Table 1). Étant donné que les bactéries lactiques indigènes sont généralement considérées comme les principales responsables de la production d'amines biogènes (BA) dans le vin, la formation de ces composés a également été évaluée. Les résultats rapportés dans le tableau S1 montrent une faible présence de BA dans tous les vins analysés en amphore.

La composition phénolique des vins élevés en amphore a été suivie pendant 12 mois (tableau S2), et Figure 3 montre l'évolution des principales classes phénoliques. Les stilbènes n'ont pas été signalés car ils n'ont été détectés qu'à des niveaux non significatifs (<0,5 mg/L, tableau S2). La concentration des acides hydroxycinnamiques et des flavonols a diminué au cours des 12 mois avec une réduction moyenne de 30 % et 14 %, respectivement. Au contraire, la teneur en acides hydroxybenzoïques, flavan-3-ols et alcools, qui sont les composés phénoliques les plus présents dans ces vins, est restée inchangée. Aucune variation n'a également été observée pour les composés phénoliques d'origine microbienne : alcools phénoliques et phénols volatils (Figure 3). Les alcools phénoliques (tyrosol, tryptophol et hydroxytyrosol) sont principalement produits par *S. cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique à partir de la tyrosine et du tryptophane, tandis que les phénols volatils (vinylphénols et éthylphénols) sont principalement produits par *Brettanomyces* et sont responsables de certains défauts sensoriels du vin. Cependant, la concentration de phénols volatils était inférieure au seuil sensoriel.

**Tableau 1.** Paramètres chimiques et microbiologiques des vins lors de l'élevage en amphores de 300 L. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les échantillons collectés à un temps de vieillissement différent de chaque amphore (ANOVA, test de Tukey à  $p < 0,01$ ).

Mois	A1+2 (Anchor VIN13)			A3+4 (Aroma White Enartis)			A5+6 (Spontaneous)		
	4	6	12	4	6	12	4	6	12
Glucose (g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Fructose (g/L)	0.2 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.5 b	0.5 b
Ethanol (% v/v)	11.8 ± 0.3 a	11.8 ± 0.1 a	11.7 ± 0.1 a	11.8 ± 0.0 a	11.8 ± 0.0 a	11.7 ± 0.1 a	11.8 ± 0.0 a	11.8 ± 0.1 a	11.9 ± 0.0 a
Glycerol (g/L)	5.8 ± 0.3 a	5.8 ± 0.0 a	5.8 ± 0.1 a	5.7 ± 0.3 a	5.7 ± 0.1 a	5.8 ± 0.0 a	5.8 ± 0.1 a	5.8 ± 0.0 a	5.8 ± 0.1 a
Acetic acid (g/L)	0.23 ± 0.00 a	0.23 ± 0.00 a	0.30 ± 0.01 b	0.21 ± 0.00 a	0.21 ± 0.01 a	0.25 ± 0.01 a	0.18 ± 0.01 a	0.18 ± 0.00 a	0.20 ± 0.01 a
Lactic acid (g/L)	1.87 ± 0.03 a	1.87 ± 0.04 a	1.87 ± 0.07 a	1.83 ± 0.04 a	1.83 ± 0.06 a	1.83 ± 0.00 a	1.95 ± 0.00 a	1.95 ± 0.04 a	1.95 ± 0.04 a
<i>S. cerevisiae</i> (CFU/mL)	5.60 × 10 <sup>3</sup> a	6.40 × 10 <sup>2</sup> b	<10	2.40 × 10 <sup>2</sup> a	30 b	<10	3.23 × 10 <sup>4</sup> a	4.9 × 10 <sup>2</sup> b	<10
<i>O. oeni</i> (CFU/mL)	7.60 × 10 <sup>3</sup> a	1.66 × 10 <sup>2</sup> b	<10	3.00 × 10 <sup>3</sup> a	1.52 × 10 <sup>2</sup> b	<10	6.56 × 10 <sup>4</sup> a	1.18 × 10 <sup>4</sup> b	<10
<i>B. bruxellensis</i> (CFU/mL)	1.60 × 10 <sup>3</sup>	<10	<10	1.70 × 10 <sup>2</sup> a	6.10 × 10 <sup>2</sup> b	<10	3.00 × 10 <sup>3</sup>	<10	<10



**Figure 3.** Evolution des composés phénoliques des vins au cours de l'élevage réalisé dans des amphores de 300 L. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre le même échantillon d'amphore collecté à différentes périodes de vieillissement. (ANOVA, test de Tukey à  $p < 0,01$ ).

### 3.3. Biodiversité de *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique dans des amphores de 300 L

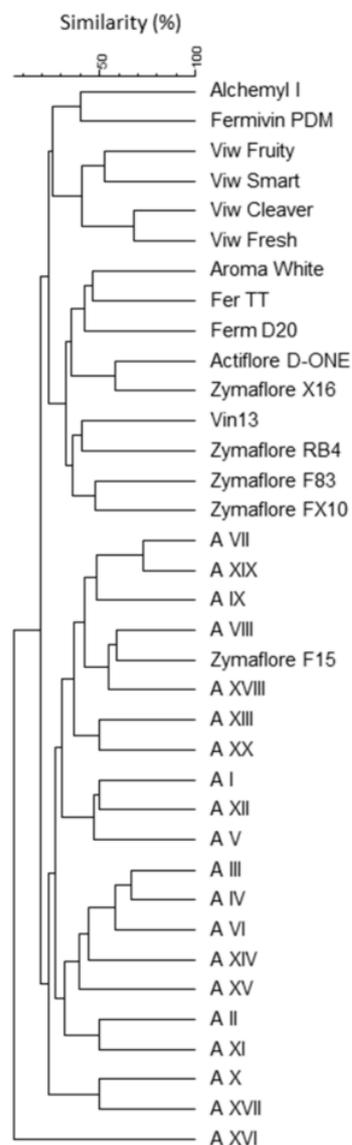
L'échantillonnage du microbiote de levure a été réalisé lorsque les populations de *S. cerevisiae* étaient présentes à des concentrations supérieures à 10<sup>6</sup> CFU/mL à quatre points différents du processus de fermentation alcoolique. La caractérisation intraspécifique via l'analyse des régions inter- $\delta$  a été réalisée sur près de 500 isolats de *S. cerevisiae*. Pour reconnaître les souches indigènes de *S. cerevisiae*, les profils inter- $\delta$  obtenus ont été comparés aux profils de certains levains commerciaux. Elles ont notamment été comparées aux souches Anchor VIN13 et Aroma White Enartis utilisées dans cette expérimentation ainsi qu'aux souches starter normalement utilisées en cave pour réaliser des vinifications industrielles. La comparaison a mis en évidence 20 modèles différents reconnus comme souches indigènes de *S. cerevisiae*, et leurs fréquences d'isolement sont rapportées dans Tableau 2. Les deux starters commerciaux utilisés dans les vinifications en amphores n'ont pas réussi à dominer complètement le processus de fermentation. En effet, la souche Anchor VIN13, inoculée dans les amphores 1 et 2, a montré une fréquence d'isolement d'environ 27%, tandis que Aroma White Enartis, inoculée dans les amphores 3 et 4, a montré une fréquence d'isolement plus faible (environ 13%). Deux autres souches de levures commerciales habituellement utilisées dans la cave ont été trouvées en faibles pourcentages (6 à 7 %) dans les amphores inoculées. (Tableau 2). De plus, dans ces amphores, différentes souches indigènes de *S. cerevisiae* étaient présentes à différents pourcentages. En particulier, dans les amphores 3 et 4, la souche XII était présente à un

pourcentage plus élevé que la souche commerciale inoculée (20 contre 13 %). Les faibles niveaux de domination des starters commerciaux inoculés ainsi que la présence fréquente de souches natives de *S. cerevisiae* suggèrent la nécessité de sélectionner des souches indigènes de *S. cerevisiae* qui sont probablement mieux adaptées aux conditions de fermentation spécifiques et donc plus adaptées à la fermentation vinification en amphore. Néanmoins, les fermentations spontanées réalisées dans les amphores 5 et 6 n'ont pas montré de domination significative d'un nombre limité de souches indigènes, puisque leurs fréquences d'isolement variaient d'environ 2 à 13 %. Quoi qu'il en soit, il convient de souligner que seulement dans la fermentation spontanée réalisée dans l'amphore 6, une culture starter commerciale, la souche Anchor VIN13, a été trouvée mais à une faible fréquence (9%) (Tableau 2). Enfin, comparer les niveaux de diversité génétique des *S. cerevisiae* des populations isolées des six vinifications conduites en amphores, les valeurs moyennes des indices Shannon (H) et Uniformité (e) ont été calculées, hors souches starter (Tableau 2). L'indice de Shannon (H) mesure la diversité au sein d'une population, en tenant compte à la fois du nombre de profils génétiques divers et du nombre d'isolats présentant le même profil génétique, tandis que l'homogénéité (e) indique l'abondance relative des diverses souches. Les valeurs d'homogénéité vont de 0 à 1, 1 indiquant que toutes les souches se produisent au même pourcentage et les valeurs proches de 0 signifient la présence de souches à des pourcentages plus élevés ou des souches dominantes. Comme prévu, les fermentations réalisées spontanément (amphores 5 et 6) ont montré une plus grande biodiversité (H) que les autres inoculés avec des levains commerciaux (amphores 1, 2, 3, 4). À l'inverse, toutes les amphores présentent des valeurs de régularité élevées, proches de 1, soulignant l'absence de souches indigènes à dominance marquée sur les autres.

**Tableau 2.** Fréquences d'isolement exprimées en pourcentage des souches indigènes et starter de *S. cerevisiae* dans les six fermentations réalisées en amphores. Les indices de diversité ont été calculés selon Shannon et Weaver [27] pour la population de *S. cerevisiae* obtenue à partir des différentes amphores.

%	Amphore 1	Amphore 2	Amphore 3	Amphore 4	Amphore 5	Amphore 6
<i>Indigenous S. cerevisiae souches</i>						
AI	-	-	5.6	7.6	6.7	2.2
AII	-	-	6.4	6.8	6.7	4.4
AIII	-	-	-	-	4.4	2.2
AIV	-	-	-	-	4.4	2.2
AV	-	-	-	-	6.7	2.2
AVI	7.5	5.7	14.0	13.0	2.2	6.7
AVII	-	-	7.1	6.1	13.3	11.1
AVIII	-	-	6.7	6.5	4.4	8.9
AIX	-	-	-	-	4.4	-
AX	7.6	5.6	-	-	4.4	4.4
AXI	12.5	14.5	-	-	4.4	4.4
AXII	-	-	20.1	19.9	2.2	4.4
AXIII	7.7	5.5	-	-	2.2	6.7
AXIV	-	-	-	-	2.2	6.7
AXV	7.1	6.1	-	-	4.4	6.7
AXVI	-	-	-	-	6.7	2.2
AXVII	-	-	12.5	14.5	4.4	4.4
AXVIII	13.0	14.0	-	-	2.2	-
AXIX	5.6	7.6	-	-	11.1	8.9
AXX	-	-	-	-	2.2	2.2
<i>Souches Commerciales</i>						
Anchor VIN13	25.6	27.6	6.5	6.9	-	8.9
Arôme Blanc Enartis	5.7	7.7	14.3	12.3	-	-
Zymaflore X16	7.7	5.7	6.8	6.4	-	-
Enartis Ferm TT	-	-	5.6	7.6	-	-
<i>Indices de Biodiversité</i>						
H	1.87	1.91	1.82	1.86	2.85	2.83
e	0.85	0.87	0.76	0.78	0.75	0.76

L'analyse groupée des différents modèles inter- $\delta$  a mis en évidence la distance génétique élevée entre 20 souches indigènes de *S. cerevisiae* et les souches commerciales de départ puisqu'elles se sont regroupées en deux groupes différents avec un indice de similarité d'environ 20 % (Figure 4). Seul le starter commercial Zymaflore F15 a été regroupé dans le cluster comprenant les souches indigènes.



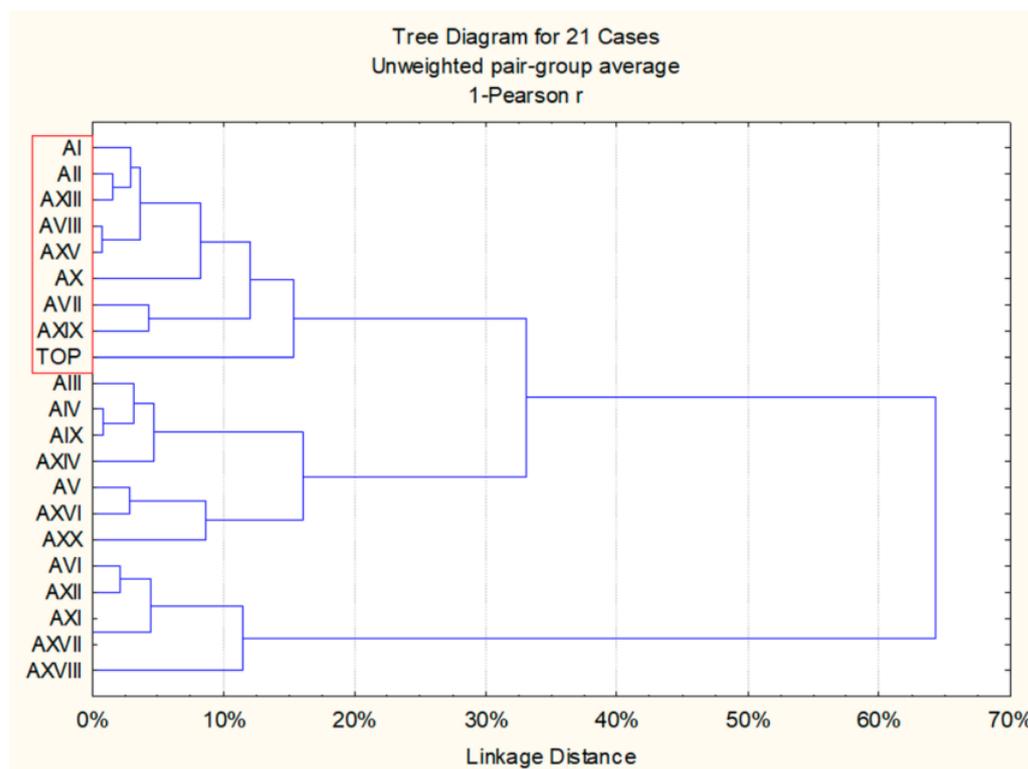
**Figure 4.** Dendrogramme UPGMA basé sur le coefficient Dice des motifs inter- $\delta$  des souches indigènes de *S. cerevisiae* isolées des fermentations réalisées en amphores et des starters commerciaux.

### 3.4. Sélection de souches indigènes de *S. cerevisiae*

Les 20 souches indigènes de *S. cerevisiae* ont été préalablement criblées pour les caractéristiques phénotypiques d'intérêt œnologique suivantes : caractère tueur, capacité à produire du sulfure d'hydrogène, activité  $\beta$ -glucosidase et activité protéase. Pour résumer ces résultats, une carte thermique avec les données standardisées du dépistage a été réalisée (Figure S2). La carte thermique comprenait également les fréquences d'isolement moyennes trouvées pour chaque souche dans les fermentations spontanées ou inoculées réalisées en amphore. Ces fréquences peuvent être interprétées comme une mesure de l'adaptabilité de ces souches à l'environnement des amphores.

Les mêmes données ont également été élaborées avec une analyse groupée pour sélectionner six souches à tester davantage en tant que démarreurs potentiels (Figure 5). Pour réaliser la sélection des souches indigènes de *S. cerevisiae* en fonction de leurs propriétés, une souche virtuelle, appelée « TOP », a été incluse dans les données

expérimentales. Les résultats virtuels attribués à la souche « TOP » étaient les suivants : présence d'un caractère tueur, faible capacité à produire du sulfure d'hydrogène, présence d'activité  $\beta$ -glucosidase, présence d'activité protéase et valeur maximale des fréquences d'isolement parmi celles enregistrées pour les souches indigènes. Les souches regroupées avec la souche « TOP » (indiquées par le carré rouge) étaient celles qui ressemblaient le plus au starter idéal. (Figure 5). Par conséquent, les souches de *S. cerevisiae* AI, AII, AVII et AVIII, présentes uniquement en fermentation spontanée, ainsi que AXV et AXIX, représentatives des souches présentes à la fois dans les fermentations spontanées et inoculées, ont été choisies pour des tests supplémentaires en laboratoire. fermentations à grande échelle.



**Figure 5.** Analyse groupée des caractéristiques des souches indigènes de *S. cerevisiae* : caractère tueur, capacité à produire du sulfure d'hydrogène, activité  $\beta$ -glucosidase, activité protéase, fréquences moyennes d'isolement trouvées dans les fermentations spontanées ou inoculées réalisées en amphore.

Les six souches indigènes de *S. cerevisiae* ont été testées au cours de fermentations de 160 ml sur du jus de raisin Trebbiano Toscano afin d'évaluer les propriétés œnologiques et technologiques spécifiques à chaque souche. Chaque souche a été inoculée individuellement à une concentration de  $2 \times 10^6$  CFU /mL. Les résultats des analyses chimiques effectuées à la fin de chaque fermentation alcoolique (après 10 jours à partir de l'inoculum de la souche de levure) sont présentés dans le Tableau 3. Après cette période, la consommation de sucre s'est achevée avec une faible production d'acide acétique (<0,3 g/L) pour toutes les souches testées. Ces souches ont également fait preuve d'une grande vigueur fermentaire (CO<sub>2</sub> produit en 48 h supérieur à 6 g/100 mL) et d'une production de SO<sub>2</sub> inférieure à 50 mg/L. D'autres différences statistiques entre les souches sont liées aux concentrations en polyalcool (glycérol et 2,3- butanediol), en acide lactique et en acide succinique. Enfin, le modèle de Gompertz a été utilisé pour estimer les performances fermentaires des souches en termes de taux de croissance spécifique ( $\mu$ -max) (Tableau 3). La qualité de l'ajustement de ce modèle était appropriée pour toutes les souches testées, avec des valeurs R supérieures à 0,98. Les résultats ont montré que la valeur  $\mu$ -max de la souche AVIII était significativement plus élevée que celle des autres souches. Par conséquent, la souche AVIII a été caractérisée davantage par des fermentations à l'échelle du laboratoire en utilisant de petites amphores (volume de 20 L). Deux autres souches indigènes, AI et AXIX, qui ont montré un taux de fermentation adéquat, et le starter commercial Anchor VIN13 ont également été inclus à titre de comparaison.

**Tableau 3.** Analyses chimiques effectuées à la fin de chaque fermentation alcoolique sur le moût de raisin Trebbiano Toscano et performances fermentaires des souches en termes de vitesse spécifique de fermentation ( $\mu$ -max) estimée avec le modèle de Gompertz. Des lettres différentes dans la même ligne indiquent des différences statistiquement significatives (ANOVA et test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Souche	AI		AII		AVII		AVIII		AXV		AXIX	
	Moyen	SD	Moyen	SD	Moyen	SD	Moyen	SD	Moyen	SD	Moyen	SD
Glucose (g/L)	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-
Fructose (g/L)	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-
Ethanol (% <i>v/v</i> )	11.1	0.1	11.2	0.0	11.2	0.0	11.3	0.0	11.2	0.1	11.2	0.1
Glycerol (g/L)	5.8 a	0.1	6.0 a	0.1	5.8 a	0.1	6.1 a	0.0	5.4 b	0.1	5.5 b	0.1
meso 2,3-butanediol (g/L)	0.07 ab	0.01	0.09 a	0.01	0.07 ab	0.01	0.02 b	0.01	0.03 ab	0.03	0.01 b	0.00
raceme 2,3-butanediol (g/L)	0.18 ab	0.01	0.15 ab	0.03	0.13 a	0.03	0.14 a	0.02	0.15 ab	0.01	0.23 b	0.03
Succinic acid (g/L)	1.09 a	0.01	0.86 ab	0.03	0.87 ab	0.01	0.90 ab	0.04	0.75 b	0.11	0.90 ab	0.16
Acetic acid (g/L)	0.21	0.04	0.26	0.01	0.24	0.01	0.20	0.02	0.26	0.01	0.18	0.01
Lactic acid (g/L)	0.20 a	0.01	0.15 ab	0.01	0.17 ab	0.01	0.13 b	0.03	0.16 ab	0.01	0.20 a	0.01
Fermentation rate ( $\mu$ max, h <sup>-1</sup> )	0.100 a	0.002	0.090 a	0.0004	0.093 a	0.002	0.114 b	0.006	0.097 a	0.008	0.100 a	0.004

### 3.5. Performances de fermentation des souches de levure sélectionnées dans des amphores de 20 litres

Les souches indigènes AI, AVIII et AXIX et la souche commerciale Anchor VIN13 ont été utilisées comme starters dans des fermentations à l'échelle du laboratoire réalisées dans des amphores de 20 L, chacune contenant 18 L de moût de raisin Trebbiano Toscano. Ces amphores étaient identiques aux amphores de 300 L mais plus petites. Chaque souche a été inoculée, en tant que culture axénique, à la concentration de  $2 \times 10^6$  CFU/mL, et la cinétique de fermentation a été suivie en quantifiant les concentrations d'éthanol et de sucre (figure S3a). Les souches AVIII, AXIX et Anchor VIN13 ont montré des taux de fermentation significativement plus élevés que la souche AI. En particulier, AVIII et Anchor VIN13 ont achevé la fermentation alcoolique en sept jours, AXIX en onze jours et AI en quatorze jours (figure S3b). À la fin des fermentations, l'analyse moléculaire des populations de levures a confirmé la dominance des souches *S. cerevisiae* inoculées.

Le Tableau 4 présente les résultats des analyses chimiques et microbiologiques effectuées à la fin de chaque fermentation alcoolique. La souche AVIII a produit une concentration plus élevée de glycérol que le starter commercial Anchor VIN13 et la souche AXIX, tandis que les souches AI et AXIX ont produit des concentrations plus élevées d'acide acétique. Toutes les vinifications ont montré la présence de *O. oeni*, mais la fermentation malolactique n'a eu lieu pendant la fermentation alcoolique que dans les vinifications réalisées par les souches AI et AXIX. malolactique au cours de la fermentation alcoolique.

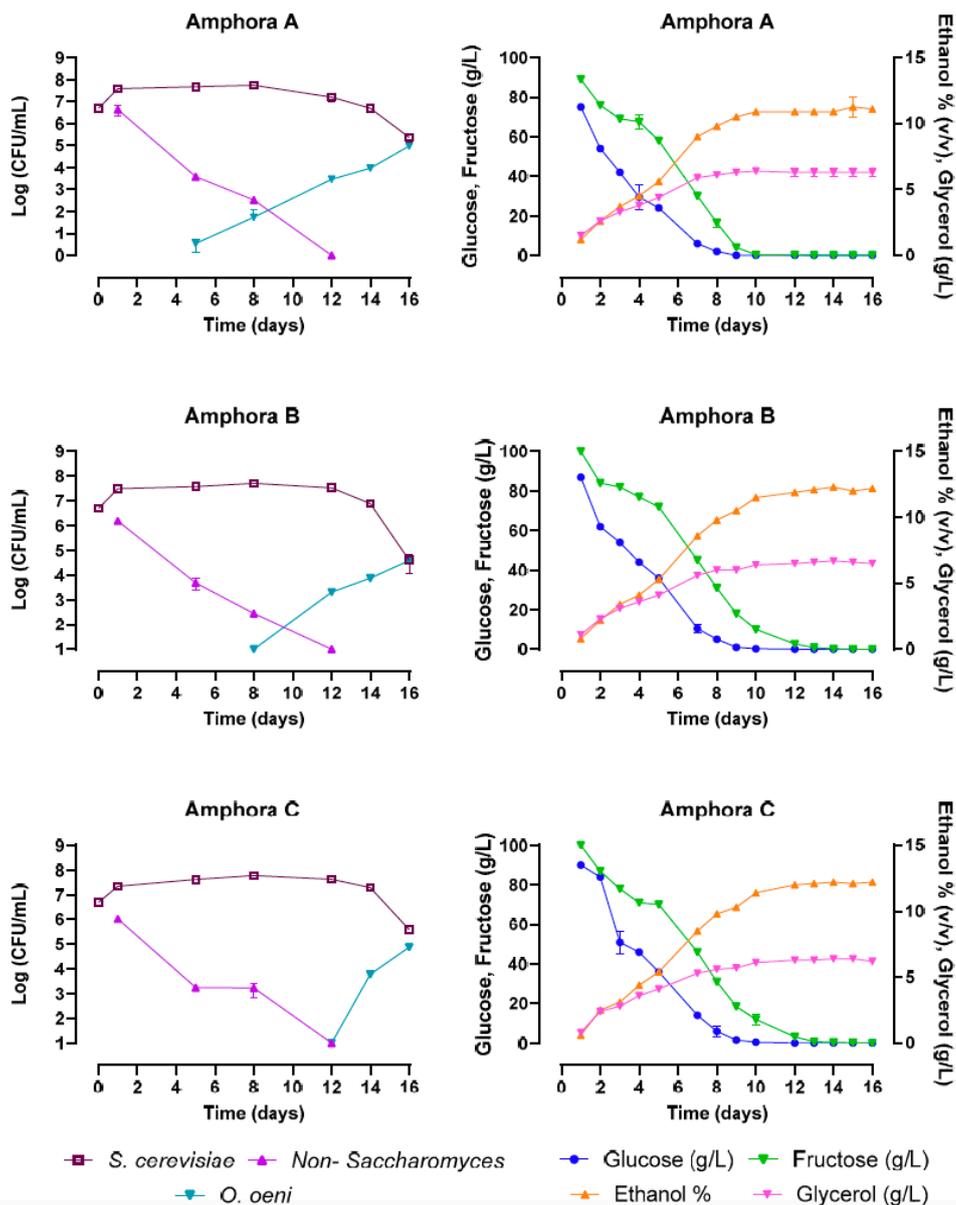
**Tableau 4.** Analyses chimiques et microbiologiques effectuées à la fin de la fermentation alcoolique réalisée dans des amphores de 20 L, et performances fermentaires des souches indigènes de *S. cerevisiae* (AI, AVIII,) et de la souche commerciale Anchor VIN13 en termes de vitesse spécifique de fermentation ( $\mu$ -max) estimée avec le modèle de Gompertz. Des lettres différentes dans la même ligne indiquent des différences statistiquement significatives (ANOVA et test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

	AI		AVIII		AXIX		VIN13	
	Moyen	SD	Moyen	SD	Moyen	SD	Moyen	SD
Glucose (g/L)	1.10 a	-	0.10 b	0.07	<0.05	-	0.10 b	-
Fructose (g/L)	0.8 ac	0.1	0.3 ab	0.1	0.1 b	0.1	0.9 c	0.1
Ethanol (% v/v)	11.3	0.4	10.8	0.4	11.0	0.1	11.4	0.0
Glycerol (g/L)	7.7 ab	0.1	8.1 a	0.1	7.4 b	0.1	7.3 b	0.1
Lactic acid (g/L)	1.23 a	0.14	0.19 b	0.01	1.50 a	0.15	0.12 b	0.03
Acetic acid (g/L)	0.31 a	0.01	0.12 b	0.02	0.30 a	0.03	0.15 b	0.03
Malic acid	<0.05	-	1.94	0.05	<0.05	-	1.97	0.08
Fermentation rate ( $h^{-1}$ )	0.056 a	0.004	0.190 b	0.008	0.167 b	0.010	0.174 b	0.008
<i>S. cerevisiae</i> (CFU/mL)	$5.43 \times 10^6$ a	$0.41 \times 10^6$	$6.80 \times 10^7$ b	$0.65 \times 10^7$	$8.40 \times 10^4$ c	$0.48 \times 10^4$	$1.50 \times 10^6$ d	$0.32 \times 10^6$
<i>O. oeni</i> (CFU/mL)	$4.05 \times 10^7$ a	$0.09 \times 10^7$	$9.10 \times 10^3$ b	$0.15 \times 10^3$	$8.00 \times 10^7$ c	$0.12 \times 10^7$	$8.80 \times 10^4$ d	$0.60 \times 10^4$

Une fois la fermentation malolactique terminée, les vins ont été stabilisés à 4°C pendant quinze jours, mis en bouteille et après trois semaines soumis à une analyse sensorielle. La caractérisation sensorielle des vins a été réalisée selon la démarche expérimentale proposée par l'OIV [34]. Le vin ayant la moyenne la plus basse des notes totales (valeur d'acceptation) est celui obtenu avec la souche XIX. La carte perceptive obtenue à partir de l'ACP appliquée aux données d'intensité moyenne des attributs significatifs est présentée dans la figure S4. La variance totale expliquée pour les attributs sensoriels basés sur les deux premières dimensions significatives est de 91%, les PC1 et PC2 représentant respectivement 65% et 26%. Le vin obtenu avec la souche AXIX se caractérise par une corrélation négative avec tous les descripteurs et, en particulier, avec ce que l'on appelle l'"impression générale". Au contraire, les vins obtenus avec les souches Anchor VIN13 et AVIII se caractérisent par une corrélation positive avec les descripteurs gustatifs, tandis que seul le vin obtenu avec la souche AVIII présente également une corrélation positive avec les descripteurs olfactifs. Le vin obtenu avec la souche AI possédait des caractéristiques intermédiaires entre les vins AVIII et VIN13. Par conséquent, les souches AVIII et AI ont été choisies comme starters indigènes pour induire des fermentations alcooliques dans les vinifications de cave réalisées dans des amphores de 300 L.

### 3.6. Utilisation de souches indigènes de *S. cerevisiae* dans des vinifications en cave réalisées dans des amphores de 300 litres

Les raisins de la variété Trebbiano Toscano ont été récoltés lors de la vendange 2022, broyés et répartis dans les mêmes amphores de 300 L que celles utilisées lors de la vendange précédente. Les souches indigènes AI et AVIII et la souche commerciale Anchor VIN13 ont été utilisées comme starters. La souche AVIII et la souche Anchor VIN13 ont été inoculées en tant que culture axénique (amphore A et C, respectivement), tandis que la souche AI a été co-inoculée avec la souche AVIII (amphore B). Dans la Figure 6, les données chimiques et microbiologiques recueillies au cours du suivi des fermentations du vin sont rapportées. Dans l'amphore A, la fermentation alcoolique a été accomplie après dix jours, tandis que dans les amphores B et C, elle a été accomplie après douze jours. Dans tous les cas, toutes les fermentations ont suivi un cours régulier et la production d'acide acétique à la fin de la fermentation était inférieure à 0,30 g/L. Toutes les fermentations en amphores ont montré la disparition des levures non-*Saccharomyces* au bout de douze jours et la croissance d'une population indigène d'*O. oeni* avant la fin de la fermentation alcoolique.



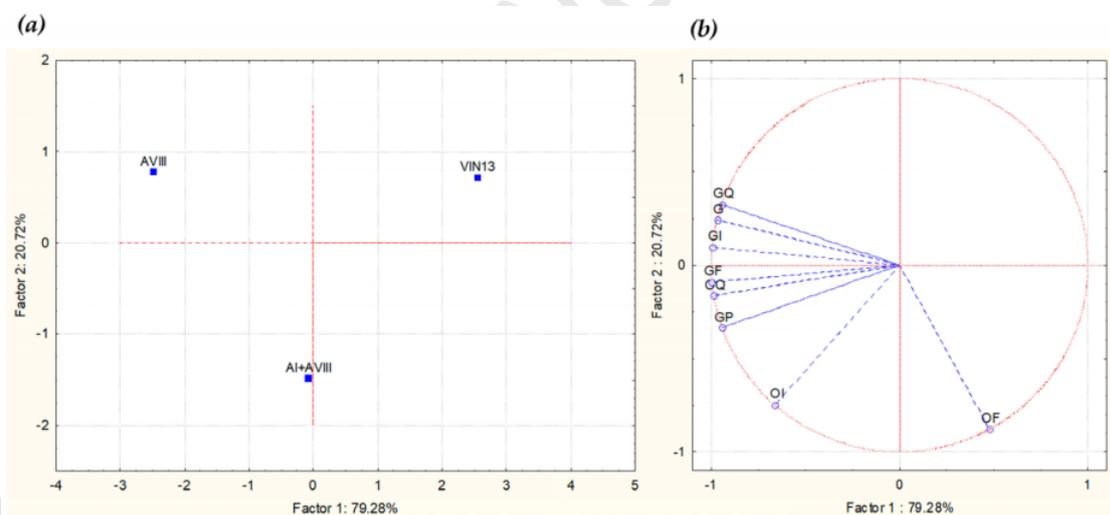
**Figure 6.** Suivi des fermentations alcooliques réalisées en vinification réelle dans des amphores de 300 litres. L'amphore A a été inoculée avec la souche AVIII, l'amphore B avec les souches AVIII et AI, l'amphore C avec le starter commercial Anchor VIN13.

Des analyses moléculaires (PCR des régions inter- $\delta$ ) ont été réalisées sur les isolats de levure collectés à la fin de chaque fermentation alcoolique. Dans le Tableau 5, les fréquences d'isolement des souches de levure présentes dans les trois fermentations alcooliques sont rapportées. La souche Anchor VIN13, qui a été inoculée en tant que culture unique dans l'amphore C, a montré une fréquence d'isolement d'environ 25 %, ce qui confirme la faible efficacité de ce starter commercial pour dominer les fermentations alcooliques réalisées dans les amphores. En effet, dans l'amphore C, la souche indigène VIII prédominait, affichant un pourcentage de 40 %. Au contraire, la souche AVIII, inoculée seule, a montré un pourcentage d'isolement de 75 %, alors que couplée à AI, ce pourcentage est tombé à 54 % (Tableau 5). Dans tous les cas, le pourcentage total d'isolement des deux souches sélectionnées dans la culture mixte (AVIII+AI) était de 79 %, ce qui démontre le plus grand " avantage de fitness " des souches indigènes correctement sélectionnées par rapport à Anchor VIN13 dans les vinifications en amphores. En ce qui concerne la présence d'autres souches de levure indigènes, neuf profils génomiques de souches indigènes ont été trouvés. Seuls deux de ces biotypes (AXI et AXIX) ont été retrouvés dans la récolte 2021.

**Tableau 5.** Fréquences d'isolement exprimées en pourcentage des souches indigènes de *S. cerevisiae* (AVIII, AI) et de la souche VIN13 d'Anchor dans les fermentations réalisées dans les amphores A, B et C.

%	Amphora A (AVIII)	Amphora B (AI+AVIII)	Amphora C (VIN13)
AI	-	25	7
AVIII	75	54	40
VIN13	-	-	25
AXI	7	-	-
AXIX	-	-	7
AXXII	11	11	-
AXXIII	-	7	-
AXXIV	-	-	3.5
AXXV	7	-	7
AXXVII	-	3	-
AXXIX	-	-	3.5
AXXXI	-	-	7

Lorsque toutes les vinifications ont également achevé la fermentation malolactique, les vins ont été mis en bouteille et, après trois semaines, soumis à une analyse sensorielle selon la méthode décrite ci-dessus. Les moyennes des notes totales (valeur d'acceptation) n'étaient pas significativement différentes entre les trois vins, ce qui démontre que les trois vins obtenus étaient exempts de défauts sensoriels. La carte perceptive obtenue à partir de l'ACP appliquée aux données d'intensité moyenne des attributs significatifs est présentée à la Figure 7. Les deux premières dimensions significatives expliquent 100 % de la variance totale, PC1 et PC2 représentant respectivement 79,3 % et 20,7 %. Seuls les vins obtenus avec les souches indigènes de *S. cerevisiae* sélectionnées (AVIII et AI+AVIII) ont montré des corrélations positives avec presque tous les descripteurs.



**Figure 7.** Analyse en composantes principales réalisée sur l'analyse sensorielle des vins obtenus dans des amphores de 300 L inoculées avec la souche AVIII (amphore A), avec les souches AVIII et AI (amphore B), et avec l'amorce commerciale VIN13 (amphore C). (a) : carte de similarité déterminée par les composantes principales (facteur 1 et 2); (b) : projection des variables sur le plan factoriel. Variables : OF : franchise olfactive ; OI : intensité olfactive ; OQ : qualité olfactive; GF: franchise gustative; GI : intensité gustative; GQ : qualité gustative; GP : persistance gustative; G : impression générale.

#### 4. Discussion

Les vins blancs obtenus à partir des raisins du cépage Trebbiano Toscano sont largement consommés en Italie. Ces vins sont généralement agréables et corrects, mais ils présentent également des caractéristiques neutres. L'utilisation d'amphores pourrait représenter un outil approprié pour rendre ces vins plus reconnaissables et appréciés, favorisant ainsi leur positionnement sur le marché. Cette étude a donc pour but d'examiner la gestion correcte des vinifications de raisins Trebbiano Toscano réalisées dans des amphores en terre cuite, en étudiant les phénomènes microbiologiques et physicochimiques qui se produisent pendant la production du vin. Le premier aspect pris en considération a été la gestion de la fermentation alcoolique. Par conséquent, les vinifications en amphores de terre cuite ont été réalisées en laissant le moût fermenter spontanément ou en utilisant deux starters commerciaux différents sélectionnés parmi ceux normalement utilisés pour les raisins Trebbiano Toscano dans la cave où l'expérimentation a été réalisée. Les fermentations spontanées et inoculées se sont terminées correctement au bout de dix à quinze jours, sans aucun défaut. Cependant, l'étude de la biodiversité de *S. cerevisiae* a montré l'incapacité des souches de starters commerciaux, utilisées dans les fermentations inoculées, à dominer complètement les souches indigènes de *S. cerevisiae*, puisqu'elles sont apparues à des fréquences de 27 et 13 %. Certains auteurs [35–37] ont indiqué que l'inoculation d'un starter de levure doit être considérée comme non réussie lorsque le pourcentage d'implantation est inférieur à 50–60% et que ce pourcentage peut varier en fonction du starter commercial utilisé ainsi que des caractéristiques des moûts de raisin et de la technologie de vinification utilisée dans le chai. Aponte et al. [29] ont observé que les différents niveaux de dominance des levures commerciales de démarrage dépendent de l'étape de fermentation ainsi que de la levure commerciale de démarrage utilisée et, à la fin de la fermentation, ils ont détecté des valeurs de pourcentage similaires à celles trouvées dans cette étude. Par conséquent, un choix adéquat des starters commerciaux à utiliser pour la gestion de la vinification en amphores devrait être effectué afin de garantir des processus de fermentation sans problème. Une alternative pourrait être l'utilisation de souches indigènes de *S. cerevisiae* sélectionnées comme starters à partir de fermentations alcooliques spontanées réalisées dans des amphores. En général, les souches de *S. cerevisiae* qui dominent numériquement les fermentations alcooliques spontanées sont plus compétitives en raison de leur plus grande capacité à s'adapter aux conditions environnementales dans lesquelles elles devront opérer [20,21]. Malheureusement, dans cette étude, les fermentations réalisées spontanément ont montré une grande biodiversité et l'absence de souches indigènes ayant une dominance marquée sur les autres. Cependant, deux souches indigènes de *S. cerevisiae* ont été sélectionnées pour leur capacité œnologique et testées dans des conditions de cave. Les résultats obtenus démontrent l'efficacité particulière d'une souche indigène de *S. cerevisiae* (AVIII) pour la gestion des fermentations alcooliques réalisées en amphores. En outre, cette souche indigène sélectionnée a également conféré des caractéristiques sensorielles distinctives au vin Trebbiano Toscano produit en amphores, contribuant ainsi à caractériser les produits finis. Les avantages de l'utilisation de souches indigènes pour la fermentation alcoolique des vins sont largement rapportés dans la littérature [29,38–45]. Cependant, cette étude représente la première tentative d'utiliser cette approche pour optimiser la production de vins dans des amphores en terre cuite.

Le deuxième aspect pris en considération dans cette étude est la gestion du vieillissement du vin dans les amphores en terre cuite. En général, pendant le vieillissement du vin, le contenu phénolique diminue car les composés phénoliques subissent des phénomènes d'hydrolyse, d'oxydation et de complexation. Le vieillissement du vin peut être effectué dans des cuves fabriquées avec différents matériaux tels que l'acier, le bois ou la terre cuite. Les cuves en acier inoxydable sont des cuves inertes, tandis que le bois et la terre cuite peuvent interagir physico-chimiquement avec le vin [6]. Lorsque le vin est élevé dans le bois, son profil sensoriel et phénolique se modifie [46]. Ces changements sont dus à la capacité des fûts en bois à micro-oxygéner le vin et à libérer des substances phénoliques et aromatiques tout en adsorbant d'autres composants. Cependant, l'élevage des vins blancs réalisé dans ce type de barrique n'est pas toujours rentable en raison d'une oxygénation trop importante et du risque d'une libération excessive de substances par le bois qui pourrait masquer les caractéristiques sensorielles du vin. [47]. Au contraire, le

vieillessement en amphore est une pratique œnologique adaptée aux vins blancs, car ces récipients peuvent protéger de l'oxydation les composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes, les acides hydroxycinnamoyl-tartriques ou les procyanidines, tout en contribuant positivement aux caractéristiques aromatiques [6]. Aucune information relative au contenu polyphénolique pendant le vieillissement des vins obtenus à partir de raisins du cépage Trebbiano Toscano n'est rapportée dans la littérature. Quoi qu'il en soit, les vins de cette étude ont démontré une grande stabilité du contenu polyphénolique, probablement en raison de la faible oxygénation pendant le vieillissement. La concentration d'oxygène dissous dans les vins expérimentaux de cette étude était significativement plus faible que celle trouvée dans d'autres études [6], prouvant la capacité des amphores à minimiser l'oxygénation du vin et, par conséquent, à protéger les composants polyphénoliques du vin de l'oxydation. Cependant, cette caractéristique ne peut être généralisée à toutes les amphores car elle dépend de leur technique de production (température de cuisson, typologie du revêtement interne, etc.), comme indiqué par Baiano et al. [5]. En effet, ces auteurs ont analysé les effets de différents types d'amphores sur le vieillissement de vins obtenus à partir de raisins blancs Minutolo. Ces vins ont montré des diminutions plus ou moins significatives des flavonoïdes et des acides hydroxycinnamiques en fonction des caractéristiques de l'amphore utilisée [5,6]. Dans cette étude, des tendances similaires ont été observées pour les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes dans les vins vieillis en amphore issus du cépage blanc Trebbiano Toscano.

Malgré la faible teneur en oxygène dissous, des contaminations par la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* ont été constatées. Cette levure est principalement associée aux vins vieillis en barriques et à une fermentation lente ou bloquée. [48], même si des études récentes indiquent que les raisins sont la source primaire possible d'un flux vers l'environnement de la cave [49]. Par conséquent, une attention particulière doit être accordée à la qualité des raisins utilisés pour la fermentation en amphores, et la détection de *Brettanomyces* au cours de l'affinage des vins est conseillée pour intervenir avant que le vin ne soit irrémédiablement endommagé par cette levure d'altération.

Enfin, les vins produits en amphores au cours de cette étude ont montré une susceptibilité particulière à la fermentation malolactique spontanée. Cet aspect est peut-être lié aux caractéristiques microaérophiles des amphores. Quoi qu'il en soit, d'autres études seraient nécessaires pour comprendre l'impact des amphores sur la cinétique de croissance des bactéries malolactiques indigènes. Cet aspect est intéressant non seulement pour la gestion technologique, mais aussi pour les effets hygiéniques et sanitaires liés à la production possible d'amines biogènes par les bactéries malolactiques indigènes [50].

## 5. Les Conclusions

L'utilisation d'amphores associées à des souches indigènes sélectionnées de manière appropriée a permis la production d'un vin Trebbiano Toscano aux caractéristiques sensorielles distinctives et à la teneur stable en polyphénols. L'étude met également en évidence certaines questions microbiologiques critiques liées à l'utilisation d'amphores pour la production de vin : l'importance d'un choix correct de l'amorce *S. cerevisiae*, le risque de contamination par la levure *Brettanomyces* et le développement éventuel d'une population indigène de bactéries malolactiques capables de produire des amines biogènes. Ces aspects doivent être pris en considération pour une gestion correcte de la production de vin en amphores.

**Matériel Supplémentaire:** Les informations complémentaires suivantes peuvent être téléchargées à l'adresse suivant : [ehttps://www.mdpi.com/article/10.3390/foods12122372/s1](https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods12122372/s1), Figure S1 : Déroulement de la recherche ; Figure S2 : Carte thermique basée sur les caractéristiques des souches indigènes de *S. cerevisiae* : caractère killer (A), capacité à produire du sulfure d'hydrogène (B), activité  $\beta$ -glucosidase (C), activité protéase (D), fréquences moyennes d'isolement trouvées dans des fermentations spontanées (E) ou inoculées (F) réalisées dans des amphores. Les valeurs de chaque activité ont été normalisées pour être comprises entre 0 et 100. Les couleurs correspondent aux valeurs standardisées de faible (blanc) à élevé (noir) ; Figure S3 : Performances de fermentation dans des amphores de 20 L des souches indigènes de *S. cerevisiae* sélectionnées (AI, AVIII, AXIX) et de la souche commerciale Anchor VIN13, suivies en quantifiant la production d'éthanol et la dégradation des sucres totaux au cours du temps ; Figure S4 : Analyse en

composantes principales réalisée sur l'analyse sensorielle des vins obtenus avec différentes souches de *S. cerevisiae* (AI, AVIII, AXIX, VIN13) dans des amphores de 20 litres. (a) : carte de similarité déterminée par les composantes principales (facteur) 1 et 2 ; (b) : projection des variables sur le plan factoriel. Variables : OF : franchise olfactive ; OI : intensité olfactive ; OQ : qualité olfactive ; GF : franchise gustative ; GI : intensité gustative ; GQ : qualité gustative ; GP : persistance gustative ; G : impression générale. Tableau S1 : Concentrations d'amines biogènes dans les vins au cours du vieillissement en amphores de 300 L. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les échantillons prélevés. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les échantillons prélevés à un moment différent du vieillissement dans chaque amphore (ANOVA, test de Tukey à  $p < 0,01$ ) ; Tableau S2 : La composition phénolique des vins vieillissants dans des amphores a été contrôlée pendant 12 mois.

**Contributions des auteurs:** Conceptualisation, S.G. et L.G. ; analyse formelle, S.M., D.B., D.G. et G.B. ; validation, D.B., G.B. et A.T. ; investigation, S.M., D.B. et D.G. ; rédaction, préparation du projet original, S.G. et S.M. ; rédaction, révision et édition, L.G. et V.G. ; visualisation, S.G., V.G. et L.G. ; acquisition des fonds, S.G. et A.T. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version publiée du manuscrit.

**Financement :** Cette recherche a été financée par le PSR 2014/2020 Metodo Leader (Mesure 16.2 "Soutien aux projets pilotes et au développement de nouveaux produits, pratiques, processus et technologies") contribution de la Regione Toscana. Titre du projet "Optimisation et valorisation des vins obtenus en amphore".

**Déclaration de disponibilité des données :** Les données sont contenues dans l'article ou dans le matériel complémentaire.

**Remerciements :** Les auteurs tiennent à remercier Cantina Sociale di Pitigliano, Cantina Tuscania srl, et Parsec srl pour leur soutien technique pendant les essais, WINEJARS Fornace Carbone Snc pour la réalisation des amphores de vin en utilisant exclusivement de l'argile certifiée d'Impruneta, selon des techniques traditionnelles et strictement à la main.

**Conflits d'intérêts :** Andrea Triossi était employé par la société D.R.E.Am. Italia. D.R.E.Am. Italia est une société basée en Toscane dont l'objectif est de soutenir le développement durable du territoire par la mise en œuvre de projets complexes et de conseils dans le domaine de la gestion des ressources naturelles. La contribution à la recherche a porté sur la coordination technique de l'expérimentation réalisée dans la cave. L'entreprise n'a pas été impliquée dans la conception de l'étude, la collecte, l'analyse, l'interprétation des données, la rédaction de cet article. Simona Guerrini, Damiano Barbato, Silvia Mangani, Giacomo Buscioni étaient employés par la société FoodMicroTeam srl. FoodMicro Team est une spin-off de l'université de Florence qui fournit une assistance technico-scientifique pour le contrôle et la gestion des fermentations du vin. Le rôle dans le projet comprenait la conception de l'étude, l'analyse, l'interprétation des données et la rédaction de cet article. L'entreprise n'a pas été impliquée dans la décision de soumettre l'article à la publication. Les autres auteurs déclarent que la recherche a été menée en l'absence de toute relation commerciale ou financière qui pourrait être interprétée comme un conflit d'intérêts potentiel.

## Referencias

1. Egaña-Juricic, M.E.; Gutiérrez-Gamboa, G.; Moreno-Simunovic, Y. Making wine in Pañul's craft pottery vessels: A first approach in the study of the dynamic of alcoholic fermentation and wine volatile composition. *Ciênc. Téc. Vitiviníc* **2022**, *37*, 29–38. [CrossRef]
2. Wine Producers Have Started Making Wine in Amphora. Available online: <https://www.bkwine.com/features/winemaking-viticulture/making-wine-inamphora/> (accessed on 10 February 2023).
3. Gil i Cortiella, M.G.; Úbeda, C.; Covarrubias, J.I.; Peña-Neira, Á. Chemical, physical, and sensory attributes of Sauvignon blanc wine fermented in different kinds of vessels. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *66*, 102521. [CrossRef]
4. Gil i Cortiella, M.; Ubeda, C.; Covarrubias, J.I.; Laurie, V.F.; Peña-Neira, Á. Chemical and physical implications of the use of alternative vessels to oak barrels during the production of white wines. *Molecules* **2021**, *26*, 554. [CrossRef] [PubMed]
5. Baiano, A.; Varva, G. Evolution of physico-chemical and sensory characteristics of Minutolo white wines during aging in amphorae: A comparison with stainless steel tanks. *LWT Food Sci. Technol.* **2019**, *103*, 78–87. [CrossRef]
6. Baiano, A.; Mentana, A.; Quinto, M.; Centonze, D.; Longobardi, F.; Ventrella, A.; Agostiano, A.; Varva, G.; De Gianni, A.; Terracone, C.; et al. The effect of in-amphorae aging on oenological parameters, phenolic profile and volatile composition of Minutolo white wine. *Food Res. Int.* **2015**, *74*, 294–305. [CrossRef]
7. Cabrita, M.J.; Martins, N.; Barrulas, P.; Garcia, R.; Dias, C.B.; Pérez-Álvarez, E.P.; Costa Freitas, A.M.; Garde-Cerdán, T. Multi-element composition of red, white and palhete amphora wines from Alentejo by ICPMS. *Food Control* **2018**, *92*, 80–85. [CrossRef]
8. Martins, N.; Garcia, R.; Mendes, D.; Freitas, A.M.C.; da Silva, M.G.; Cabrita, M.J. An ancient winemaking technology: Exploring the volatile composition of amphora wines. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *96*, 288–295. [CrossRef]
9. Capece, A.; Siesto, G.; Poeta, C.; Pietrafesa, R.; Romano, P. Indigenous yeast population from Georgian aged wines produced by traditional “Kakhetian” method. *Food Microb.* **2013**, *36*, 447–455. [CrossRef]
10. Seo, G.H.; Yun, J.H.; Chung, S.K.; Park, W.P.; Lee, D.S. Physical properties of Korean earthenware containers affected by soy sauce fermentation use. *Food Sci. Biotechnol.* **2006**, *15*, 168–172.
11. Rossetti, F.; Boselli, E. Effects of in-amphorae winemaking on the chemical and sensory profile of Chardonnay wine. *Sci. Agric. Bohemic* **2017**, *48*, 39–46. [CrossRef]
12. Day, M.P.; Schmidt, S.A.; Smith, P.A.; Wilkes, E.N. Use and impact of oxygen during winemaking. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 693–704. [CrossRef]
13. Pozzatti, M.; Guerra, C.C.; Martins, G.; dos Santos, I.D.; Wagner, R.; Ferrão, M.F.; Manfroi, V. Effects of winemaking on ‘marseLAN’ red wines: Volatile compounds and sensory aspects. *Ciênc. Téc. Vitiviníc* **2020**, *35*, 63–75. [CrossRef]
14. Tarko, T.; Duda-Chodak, A.; Sroka, P.; Siuta, M. The impact of oxygen at various stages of vinification on the chemical composition and the antioxidant and sensory properties of white and red wines. *Int. J. Food Sci.* **2020**, *2020*, 7902974. [CrossRef] [PubMed]
15. Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S. Yeast and its importance to wine aroma—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2020**, *21*, 97–129. [CrossRef]
16. Vilanova, M.; Sieiro, C. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 929–933. [CrossRef] [PubMed]
17. King, E.S.; Swiegers, J.H.; Travis, B.; Francis, I.L.; Bastian, S.E.; Pretorius, I.S. Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc wines. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10829–10837. [CrossRef]
18. Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **2000**, *16*, 675–729. [CrossRef]
19. Francesca, N.; Chiurazzi, M.; Romano, R.; Aponte, M.; Settanni, L.; Moschetti, G. Indigenous yeast communities in the environment of “Rovello bianco” grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 337–351. [CrossRef]
20. Ganucci, D.; Guerrini, S.; Mangani, S.; Vincenzini, M.; Granchi, L. Quantifying the effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of predominant *Saccharomyces cerevisiae* strains occurring in spontaneous wine fermentations. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1563. [CrossRef]
21. Granchi, L.; Ganucci, D.; Buscioni, G.; Mangani, S.; Guerrini, S. The biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* in spontaneous wine fermentation: The occurrence and persistence of winery-strains. *Fermentation* **2019**, *5*, 86. [CrossRef]
22. Guerrini, S.; Barbato, D.; Guerrini, L.; Mari, E.; Buscioni, G.; Mangani, S.; Romboli, R.; Galli, V.; Parenti, A.; Granchi, L. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and exploitation of a pilot-plant to produce fresh yeast starter cultures in a winery. *Fermentation* **2021**, *7*, 99. [CrossRef]
23. Spagna, G.; Barbagallo, R.N.; Pifferi, P.G. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4619–4627. [CrossRef]
24. Mateo, J.J.; Jimenez, M. Monoterpenes in grape juice and wines: Review. *J. Chromatography A* **2000**, *881*, 557–567. [CrossRef] [PubMed]
25. Granchi, L.; Bosco, M.; Messini, A.; Vincenzini, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *87*, 949–956. [CrossRef]
26. Legras, J.L.; Karst, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *221*, 249–255. [CrossRef]
27. Shannon, S.E.; Weaver, W. *The Mathematical Theory of Communication*; University of Illinois Press: Urbana, IL, USA, 1963.
28. Philliskirk, G.; Young, T.W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1975**, *41*, 147–151. [CrossRef]
29. Aponte, M.; Romano, R.; Villano, C.; Blaiotta, G. Dominance of *S. cerevisiae* Commercial Starter Strains during Greco di Tufo and Aglianico Wine Fermentations and Evaluation of Oenological Performances of Some Indigenous/Residential Strains. *Foods* **2020**,

- 9, 1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hernandez, L.F.; Espinosa, J.C.; Fernandez-Gonzalez, M.; Briones, A.  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *80*, 171–176. [[CrossRef](#)]
31. Flores, M.G.; Rodríguez, M.E.; Oteiza, J.M.; Barbagelata, R.J.; Lopes, C.A. Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *249*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Guerrini, S.; Galli, V.; Barbato, D.; Facchini, G.; Mangani, S.; Pierguidi, L.; Granchi, L. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* on the physicochemical and sensory characteristics of sparkling pear cider (Perry). *Eur. Food Res. Technol.* **2023**, *249*, 341–352. [[CrossRef](#)]
33. Tuberoso, C.I.G.; Congiu, F.; Serreli, G.; Mameli, S. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chem.* **2015**, *175*, 29–35. [[CrossRef](#)]
34. Anonymous. *OIV Standard for International Wine and Spirituous Beverages of Vitivicultural Origin Competitions Resolution; OIV/CONCOURS 332A/2009*; International Organization of Vine and Wine General Assembly (OIV): Zagreb, Croatia, 2009.
35. Lange, J.N.; Faasse, E.; Tantikachornkiat, M.; Gustafsson, F.S.; Halvorsen, L.C.; Kluftinger, A.; Ledderhof, D.; Durall, D.M. Implantation and persistence of yeast inoculum in Pinot noir fermentations at three Canadian wineries. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *180*, 56–61. [[CrossRef](#)]
36. Delteil, D. Aspectos prácticos del levadurado en condiciones mediterráneas. Técnica de inoculación y relación entre la población seleccionada y la población indígena. *Rev. Fr. Oenologie* **2004**, *189*, 1–13.
37. Clavijo, A.; Calderon, I.L.; Paneque, P. Effect of the use of commercial *Saccharomyces* strains in a newly established winery in Rond (Malaga, Spain). *Antonie Van Leeuwenhoek* **2011**, *99*, 727–731. [[CrossRef](#)]
38. Maqueda, M.; Nevado, F.P.; Regodón, J.A.; Zamora, E.; Álvarez, M.L.; Rebollo, J.E.; Ramírez, M. A low-cost procedure for the production of fresh autochthonous wine yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 459–469. [[CrossRef](#)]
39. Tristezza, M.; Vetrano, C.; Bleve, G.; Spano, G.; Capozzi, V.; Logrieco, A.; Mita, G.; Grieco, F. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiol.* **2013**, *36*, 335–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tristezza, M.; Fantastico, L.; Vetrano, C.; Bleve, G.; Corallo, D.; Grieco, F.; Mita, G. Molecular and Technological Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains Isolated from Natural Fermentation of Susumaniello Grape Must in Apulia, Southern Italy. *Int. J. Microbiol.* **2014**, *2014*, 897428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Tristezza, M.; Vetrano, C.; Bleve, G.; Grieco, F.; Tufariello, M.; Quarta, A.; Mita, G.; Spano, G. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 81–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* **2015**, *181*, 75–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Garofalo, C.; El Khoury, M.; Lucas, P.; Bely, M.; Russo, P.; Spano, G.; Capozzi, V. Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *118*, 1395–1408. [[CrossRef](#)]
44. Grieco, F.; Tristezza, M.; Vetrano, C.; Bleve, G.; Panico, E.; Mita, G.; Logrieco, A. Exploitation of autochthonous microorganism potential to enhance the quality of Apulian wines. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 67–73. [[CrossRef](#)]
45. Capece, A.; Pietrafesa, R.; Siesto, G.; Romaniello, R.; Condelli, N.; Romano, P. Selected Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Profitable Strategy to Preserve Typical Traits of Primitivo Wine. *Fermentation* **2019**, *5*, 87. [[CrossRef](#)]
46. Tesfaye, W.; Morales, M.L.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. Evolution of phenolic compounds during an experimental aging in wood of Sherry vinegar. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7043–7061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ortega-Heras, M.; González-Sanjosé, M.L.; González-Huerta, C. Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chem.* **2007**, *103*, 1434–1448. [[CrossRef](#)]
48. Suárez, R.; Suárez-Lepe, J.A.; Morata, A.; Calderón, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review. *Food Chem.* **2007**, *102*, 10–21. [[CrossRef](#)]
49. Oro, L.; Canonico, L.; Marinelli, V.; Ciani, M.; Comitini, F. Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 415. [[CrossRef](#)]
50. Vincenzini, M.; Guerrini, S.; Mangani, S.; Granchi, L. Amino Acid Metabolisms and Production of Biogenic Amines and Ethyl Carbamate. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine*; Part III; Helmut, K., Gottfried, U.-d., Jurgen, F., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; pp. 167–180.

**Avis de non-responsabilité/Note de l'éditeur :** Les déclarations, opinions et données contenues dans toutes les publications sont uniquement celles du ou des auteurs et contributeurs individuels et non de MDPI et/ou du ou des éditeurs. MDPI et/ou le(s) éditeur(s) déclinent toute responsabilité pour tout préjudice corporel ou matériel résultant des idées, méthodes, instructions ou produits mentionnés dans le contenu.