Article publié dans revue Française d'œnologie n°262-Janvier février 2014

IDENTIFICATION DES SEUILS DE DETECTION ET DE L'IMPACT ORGANOLEPTIQUE DES PRINCIPALES AMINES BIOGENES DANS LES VINS MEDITERRANEENS

Lucile Pic-Blateyron[1], Daniel Granés[1], Margaux Cavailles[2], Eric Bontemps[1].

[1] ICV (Institut Coopératif du Vin), La Jasse de Maurin, 34970 Lattes, France
[2] Master Ingénierie des Cosmétiques, Arômes et Parfums - Université Montpellier II-34 000 Montpellier-France

Résumé
Les risques sanitaires liés à la présence d'amines biogènes dans les vins sont maintenant connus et pris en compte par la profession. Cependant, bien que le caractère aromatique négatif d'une partie de ces molécules soit bien connu, peu d'études ont été publiées sur l'impact organoleptique de leur présence dans les vins. Cette étude s'attache donc à évaluer, les seuils de détection et l'impact organoleptique, dans des vins méditerranéens, des principales amines biogènes, à savoir l'histamine, la tyramine, la cadavérine et la putrescine. Des essais ont été conduits sur des vins blancs et rouges. Ils ont mis en évidence que sur ce type de matrice, des teneurs élevées (>100 mg/l) d'un mélange des 4 amines biogènes précitées avait un impact négatif sur la perception du vin. En outre, il a aussi été démontré que l'ajout à ce mélange d'une cinquième amine biogène au caractère volatil, abaissait nettement le seuil de détection.
Mots clés : vins, amines biogènes, seuils de détection, test 3-AFC, ASDQ

Abstract*:*
Health risks related to the presence of biogenic amines in wines are now known and taken into account by the wine industry. However, although the negative aromatic character of a part of these molecules is well known, few studies have been published on the organoleptic impact of their presence in wine. This work aims to evaluate, thresholds and organoleptic impact on Mediterranean wines of the main biogenic amines, i.e. histamine, tyramine, cadaverine and putrescine. Tests were lead on red and white wines. They showed that on this type of matrix, high levels (> 100 mg / l) of a mixture of four biogenic amines above had a negative impact on the perception of wine. In addition, it was also demonstrated that the addition of this mixture to a fifth biogenic amine volatility, significantly lowered the threshold of detection.

Keywords: wines, biogenic amines, threshold, 3-AFC test, QDSA

Introduction:

Les amines biogènes sont des bases organiques, de faible poids moléculaire, qui sont générées, à partir de leurs acides aminés précurseurs, par des décarboxylases microbiennes.

Le terme d'amines biogènes regroupe des molécules d'origine biologique, de différentes structures chimiques possédant un groupement aminé. Cette structure chimique peut être aliphatique (putrescine, cadavérine), aromatique (tyramine, phényléthylamine) ou hétérocyclique (histamine, tryptamine).

Les quatre amines biogènes les plus couramment retrouvées dans le vin, sont l'histamine, la tyramine, la putrescine et la cadavérine. La putrescine étant la substance retrouvée la plus abondamment *(Soufleros et al., 1998*).

Les teneurs en amines biogènes croissent au cours de la fermentation alcoolique. Toutefois, la plus forte augmentation est habituellement observée lors de la fermentation malolactique et au cours du processus de vieillissement (*Ancín-Azpilicueta et al, 2008*). Il faut savoir que certaines souches de bactéries lactiques sont plus propices à la formation d'amines biogènes de par leur déterminisme génétique (Coton et al, 2010). De plus il est prouvé que lorsque l'on a recours à l'inoculation bactérienne, on diminue fortement les risques de production d'amines biogènes. L'OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) s'en est inquiété, et a adopté en 2011, un code de bonnes pratiques vitivinicoles en vue de limiter au maximum la présence d'amines biogènes dans les vins (Résolution OIV –CST 369-2011).

L'intérêt porté à la maîtrise de la teneur en ces molécules se justifie par deux de leurs principales propriétés à savoir leur toxicité et leur impact sensoriel.

En effet, les amines biogènes sont connues comme des substances présentes dans de nombreux aliments fermentés (exemple : fromage, cidre…); elles sont à l'origine de réactions allergiques et d'inflammations (*Silla-Santos., 1996*). L'histamine est l'amine biogène retrouvée le plus fréquemment lors d'intoxication.

Pures, certaines de ces amines biogènes sont aussi connues pour le caractère négatif de leurs arômes (*Lehtonen et al., 1992*).

A ce jour, peu d'études ont été publiées sur l'influence de la concentration de ces composés organiques dans les vins. Seuls *R. Waller., 2005 et M.E. Arena, 2001* ont évalué l'impact de la putrescine d'une part et de la cadavérine d'autre part sur des vins espagnols. Les résultats présentés portent sur des niveaux de contamination bien supérieurs à 50 $mg.l^{-1}$; ils montrent alors l'apparition d'un caractère métallique, d'arôme de viande ou putride dans le vin.

Par ailleurs*, Palamand et al., 1969* montre que sur la bière, des mélanges d'amines biogènes ajoutés entre 50 et 100 $mg.l^{-1}$ modifient les profils organoleptiques. En effet ils notent une diminution des arômes et l'apparition d'un goût "vaguement discordant".

Nous avons donc souhaité au cours de ce travail acquérir des connaissances sur l'impact organoleptique des amines biogènes dans les vins méditerranéens. Nous avons initialement travaillé avec 4 des principales amines biogènes : histamine, putrescine, cadaverine et tyramine. En fin d'étude, nous avons intégré la phényléthylamine, amine biogène volatile, connue pour son impact sur les seuils de détection des autres molécules en présence.

Nous avons choisi de décomposer le travail en 3 étapes : (1) détermination des seuils de détection de chaque amine biogène dans des matrices vins, (2) détermination des seuils de détection des amines biogènes en mélange (en effet, on retrouve en général dans les vins plusieurs amines biogènes associées) et (3) étude de l'impact de la présence de ces amines biogènes sur la perception des autres caractéristiques organoleptiques des vins.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS : MATRICES UTILISEES

La matrice vin, de par la richesse de sa composition se révèle être une matrice difficile pour la détermination de seuils de perception.

Dans un premier temps, nous avons utilisé une *matrice hydro-alcoolique*. Cette dernière doit se rapprocher des sensations basiques ressenties lors de la dégustation d'un vin (alcool, amertume, astringence…). Plusieurs mélanges hydroalcooliques acidifiés ont été présentés aux jurys qui ont validé une matrice composée de 1 ,5% d'éthanol ; 3% de sel de potassium dodécahydraté, 2% de caféine et 2% d'acide tartrique comme matrice proche des sensations "vin" sur les descripteurs acidité, amertume et astringence.

Dans un second temps, nous avons retenu 4 *matrices « vin »* de la région Languedoc-Roussillon : 2 matrices vin blanc [Sauvignon (coteaux du LIBRON, 2011) et Chardonnay (Pays d'Oc, 2011)] et 2 matrices vin rouge [Grenache-Syrah (coteaux du LIBRON, 2011) et Merlot (Pays d'Oc, 2010)].

METHODES : DETERMINATION DE SEUILS DE DETECTION

Nature des exercices retenus **:**

En vue de familiariser le jury avec les amines biogènes, nous avons utilisé le test des concentrations croissantes (**Norme ISO NF V 09-002**).

Afin de déterminer les seuils de détection, nous avons choisi une des méthodes de tests triangulaires : méthode du test-3-AFC (dite aussi méthode à choix forcé et décrite dans la **Norme ISO 13301 : 2002(F)**).

C'est un moyen rapide et efficace de déterminer un seuil de détection pour un groupe. Ce test est de type discriminatif, c'est-à-dire que les dégustateurs ont une série de 3 verres dont 2 identiques et ils doivent déterminer l'échantillon différent des 2 autres.

A l'issue de cet essai, le seuil de détection retenu est la concentration du stimulus pour laquelle 2/3 des jurys ont correctement identifié l'échantillon différent. Enfin, la familiarité avec la substance est également une exigence dans l'essai 3-AFC. C'est pour cela que nous avons dans un premier temps réalisé les tests dans la matrice hydro-alcoolique précédemment décrite avant de travailler dans les matrices vins.

Sélection des concentrations testées :

Afin de déterminer la base des concentrations avec lesquelles nous allions travailler en solution hydro-alcoolique, nous avons recherché dans les données du LAC (Laboratoire Analyse Chromatographique ICV Maurin- Méthode de dosage Cofrac) quelles étaient, pour chaque amine biogène, les valeurs minimales et maximales mesurées dans l'ensemble des vins analysés sur 3 ans (*tableau 1*). Le dosage est réalisé par HPLC (selon le Recueil International des méthodes d'analyse par la méthode de type II).

	Laboratoire ICV (mg.L^{-1})			
	min	max	moyenne	% moyen de chaque amine
Histamine	0,3	8,3	2,1	16.8%
Putrescine	0,1	15,3	4,9	39.1%
Tyramine	0,1	7,4	1,6	13.0%
Cadavérine	0,0	17,8	3,9	31.1%
Total des 4 Amines biogènes	0,5	48,8	12,5	

Tableau 1 : Quantités retrouvées dans les vins analysés à ICV de 2009 à 2012 (129 vins)

A partir des valeurs obtenues au LAC, nous avons (1) d'une part établi la fourchette de concentrations à tester en solution hydro-alcoolique pour les tests de seuils de détection de chaque amine biogène "isolée" (Tableau 2) et (2) d'autre part déterminé la contribution moyenne de

chacune de ces amines biogènes dans un vin afin de définir la composition du mélange pour les seuils de détection de ces 4 amines biogènes en mélange.

La concentration moyenne du mélange retrouvé dans les vins, étant de **12,5** $mg.L^{-1}$, nous avons donc choisi, une gamme de concentration en conséquence : **10, 15 et 20** $mg.L^{-1}$ pour le travail en mélange.

Les résultats de chaque séance de dégustation ont été intégrés pour faire évoluer les fourchettes de concentrations testées d'une séance à l'autre.

Pour les séances en milieu vin, nous avons appliqué un facteur 10 aux seuils obtenus à l'issue du travail en solutions hydro alcoolique. Comme précédemment la plage d'intérêt sera ensuite resserrée à l'issue des dégustations.

Préparation et présentation des échantillons :

Pour la réalisation de ces tests, nous avons choisi selon la **norme ISO 11056**, un groupe de 10 sujets expérimentés (œnologues), ce qui permet de déterminer un seuil de détection avec un petit nombre de sujet (Sujets expérimentés, hautement entraînés au produit et à l'évaluation de la caractéristique étudiée, nombre minimal de sujets : 5).
Pour les dégustations, nous avons utilisé des verres noirs INAO, contenant 40 mL de produit, codés à l'aide de nombres à trois chiffres et disposés aléatoirement.

METHODES : IMPACTS DES AMINES BIOGENES SUR LES AUTRES CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DES VINS

Les tests discriminatifs tels le 3-AFC peuvent mettre en évidence une différence mais n'apportent aucune indication quant à sa nature. C'est pourquoi nous avons utilisé l'ASDQ (Analyse Sensorielle Descriptive Quantifiée) afin d'évaluer l'impact de la présence d'amines biogènes sur le profil organoleptique de vins, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif (*D.GRANES et al, 2009*). La méthodologie développée à l'ICV est basée sur la **norme ISO 11035**.
Cette méthode permet d'élaborer des profils sensoriels à partir de l'évaluation de l'intensité des descripteurs sensoriels.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

SEUIL DE DETECTION DES AMINES BIOGENES :

Résultats en solution hydro-alcoolique

Pour chaque amine biogène nous avons réalisé une succession de séances de dégustation :

1. un test de concentrations croissantes : il permet de retenir une fourchette de concentrations à utiliser pour le test 3-AFC
2. plusieurs tests 3-AFC : d'une série de test à l'autre, l'intervalle des concentrations testées est réduit par dichotomie afin de se rapprocher au plus près du seuil de détection en un minimum de séances.

Pour chacune de ces séances, nous présentons au jury des séries indépendantes, ce qui permet de noter d'une part l'olfactif et d'autre part le gustatif.
Les concentrations pour lesquelles au moins les 2/3 des dégustateurs ont identifié l'échantillon différent des témoins sont jugées supérieures au seuil de détection.

Ainsi pour chacune des 4 amines biogènes étudiées nous avons ciblé une plage de concentration différente en rapport avec les valeurs généralement mesurées dans les vins (*Tableau 2*).

Suite aux réponses obtenues sur l'ensemble des séances de travail, nous avons effectué une synthèse des données afin de déterminer un seuil de détection olfactif et un seuil de détection gustatif pour chacune de ces amines biogènes, dans la matrice hydro-alcoolique. (*Tableau 2*).

	Gamme de concentration testée	Seuil de détection olfactif	Seuil de détection gustatif
Putrescine	**1-16 mg.L^{-1}**	**3-4 mg.L^{-1}**	**7-8 mg.L^{-1}**
Cadavérine	**8-25 mg.L^{-1}**	**23-24 mg.L^{-1}**	**18-19 mg.L^{-1}**
Histamine	**7-25 mg.L^{-1}**	**23-24 mg.L^{-1}**	**10-11 mg.L^{-1}**
Tyramine	**12-23 mg.L^{-1}**	**21-22 mg.L^{-1}**	**14-15 mg.L^{-1}**

Tableau 2: Synthèse des plages de concentrations testées et des seuils de détection retenus pour les quatre amines biogènes pures en solution hydro-alcoolique

Nous avons ensuite complété ce travail par une recherche des seuils de détection d'un mélange des quatre amines biogènes (Figure 1).

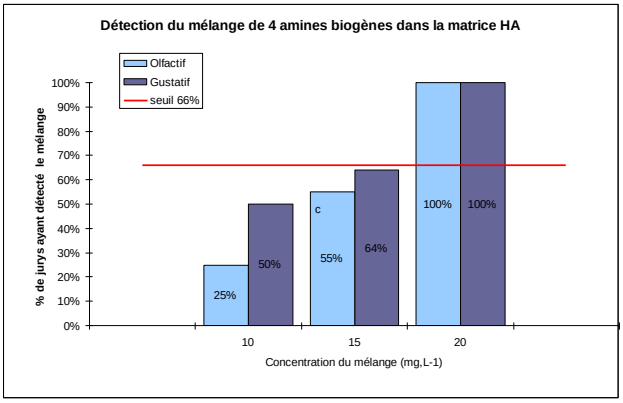

Figure 1 : Résultats obtenus avec le mélange d'amines biogènes dans la matrice hydro-alcoolique

La *figure 1* représente le % de bonnes réponses obtenues lors du travail sur les mélanges avec les 3 concentrations testées (10, 15 et 20 mg.L^{-1}). En conformité, avec les contributions généralement mesurées dans les vins de chacune de ces 4 amines biogènes (Tableau 1), les proportions de chacune des amines biogènes dans ces mélanges sont : Histamine : 17%, Putrescine : 39%, Tyramine : 13% et Cadavérine : 31%. Il apparaît, que tant au niveau olfactif que gustatif seule la concentration 20 mg.L^{-1} permet d'avoir plus de 66% de bonnes réponses.

Le seuil de détection d'un mélange des 4 amines biogènes en solution hydro-alcoolique est donc validé pour des valeurs comprises entre **15 et 20 mg.L^{-1}**

Résultats dans les vins

Avec la même méthodologie qu'en solution hydro alcoolique et le même jury, les valeurs obtenues dans les vins avec les amines biogènes pures dépassent **80 mg.L^{-1}** au niveau gustatif et **100 mg.L^{-1}** pour l'olfaction.
Les valeurs obtenues pour le mélange avec chacun des 4 vins sont présentées dans le Tableau 3.

	Fourchette de détection gustative	Gamme de détection olfactive
Vins blancs		
Sauvignon	60-80 mg.L^{-1}	80-100 mg.L^{-1}
Chardonnay	60-80 mg.L^{-1}	80-100 mg.L^{-1}
Vins rouges		
Syrah Grenache	100-120 mg.L^{-1}	100-120 mg.L^{-1}
Merlot	100-120 mg.L^{-1}	>120 mg.L^{-1}

Tableau 3 : Résultats obtenus lors des tests avec le mélange dans les vins

Le niveau des seuils mis en évidence en milieu vin est très élevé, d'une part au regard des teneurs généralement mesurées et d'autre part au regard des seuils identifiés avec des amines biogènes dans la bière (*Palamand et al., 1969*). Il est cependant notable, que contrairement à nous, ces auteurs se sont intéressés dans leurs travaux aux amines biogènes les plus volatiles (diméthylamine, éthylamine, méthylamine).

Nous avons donc complété notre étude par la mesure de l'impact de la présence dans le mélange de l'une de ces amines biogènes volatile : la phényléthylamine (Figure 2).

Dans un premier temps, nous avons regardé les seuils de détection en pur de cette molécule. Aussi bien pour l'olfaction que la gustation on atteint les 2/3 de bonnes réponses pour une concentration de 50 mg.L^{-1}. A la vue de ces résultats nous avons complété le mélange des quatre amines non volatiles avec de la phényléthylamine en respectant les proportions de ces cinq amines biogènes publiées par *Garcia-Marino, M et al., 2010* (30% putrescine – 20% cadavérine – 15% histamine – 15% tyramine – 20% phényléthylamine).

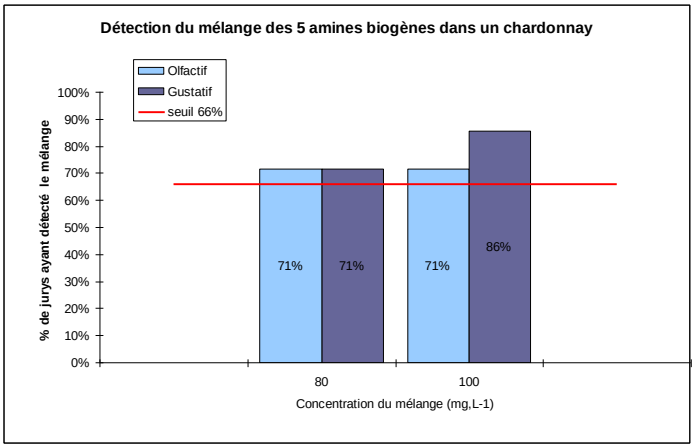

Figure 2 : Résultats obtenus avec les 5 AB dans le Chardonnay

Les tests réalisés sur Chardonnay ont montré que le seuil de détection du mélange des 5 amines biogènes était inférieur à 80 mg.L^{-1}. (*Figure 2*)

IMPACT DES AMINES BIOGENES SUR LE PROFIL ORGANOLEPTIQUE DES VINS.

Les triangulaires réalisées avec les amines biogènes en mélange ont permis de déterminer des seuils de détection. Nous avons donc cherché à savoir si, à de telles concentrations, elles pouvaient aussi amener des différences sur la perception des autres descripteurs d'un vin.

Nous avons donc effectué un travail d'Analyse Sensorielle Descriptive Quantifiée dans :

- deux matrices vin blanc (sauvignon et chardonnay) à la concentration de 100 mg/L pour le mélange de 4 amines biogènes (Figure 3et Figure 4).
- une matrice vin rouge Syrah, à la concentration de 120 mg/L pour le mélange de 4 amines biogènes (Figure 5).

Vins blancs :

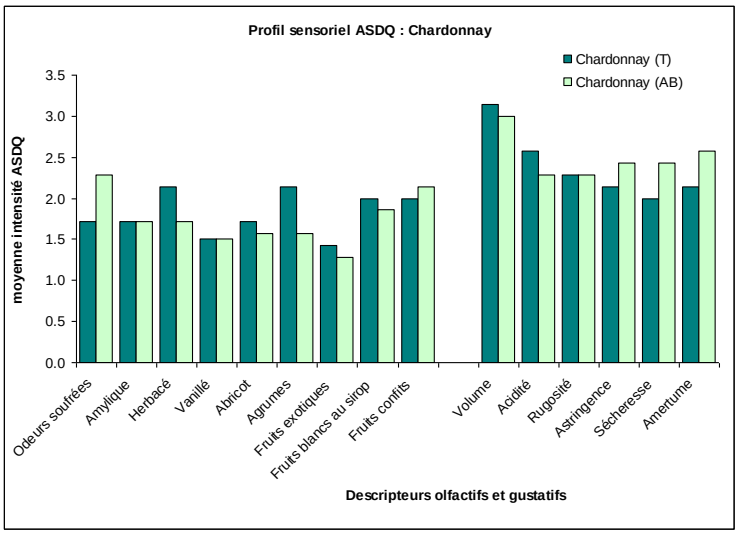

Figure 3 : Représentation du profil sensoriel obtenu par ASDQ du Chardonnay. On compare le vin contaminé ([AB]°=100 mg.L^{-1}), et le vin témoin (T)

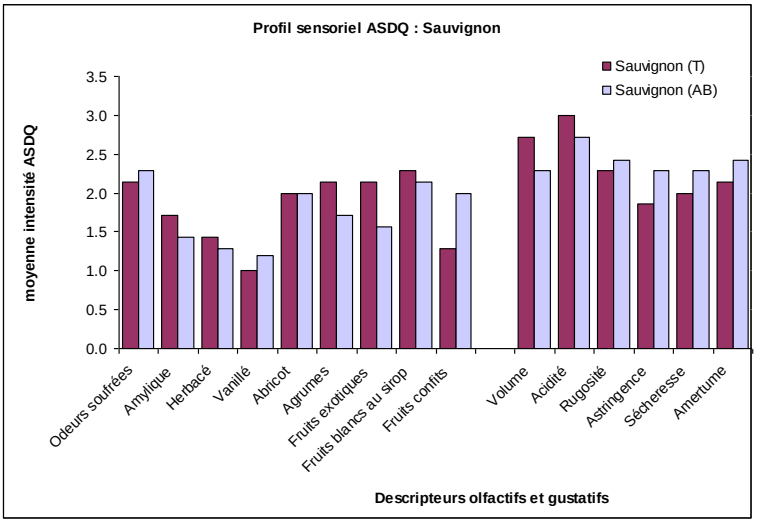

Figure 4 : Représentation du profil sensoriel obtenu par ASDQ du Sauvignon. On compare le vin contaminé ([AB]°=100 mg.L^{-1}), et le vin témoin (T)

On note que le mélange d'amines biogènes induit un effet masquant sur certains arômes(agrumes, fruits exotiques, fruits blancs au sirop). Concernant les caractéristiques gustatives, les amines biogènes intensifient la sécheresse, l'amertume, la rugosité et l'astringence du vin, et diminuent son acidité et son volume. Notons, que l'impact des amines biogènes est de manière générale plus marqué sur le sauvignon que sur le chardonnay. Sur vin rouge, on retrouve les mêmes conclusions que sur les blancs. A savoir une diminution de l'intensité des descripteurs fruités, et une augmentation de la sécheresse et de l'amertume.

Vin rouge :

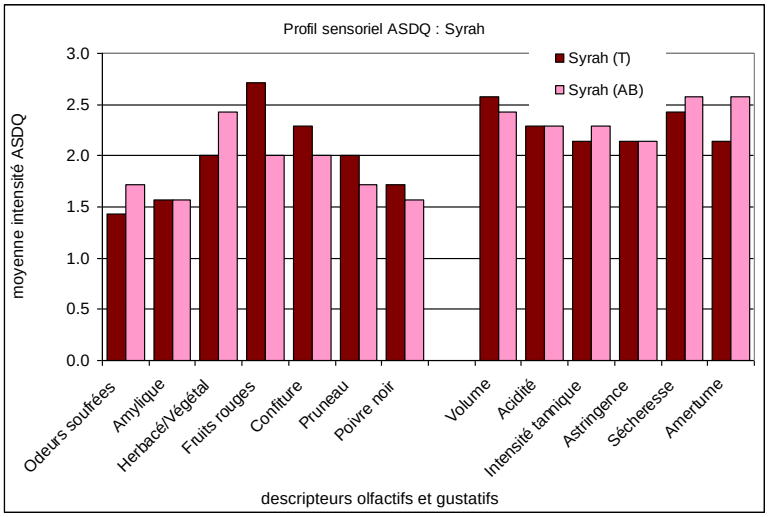

Figure 5 : Représentation du profil sensoriel obtenu par ASDQ du Syrah. On compare le vin contaminé ([AB]°=120 mg.L^{-1}), et le vin témoin (T)

Quel que soit le cépage, vin blanc ou vin rouge, les amines biogènes aux concentrations testées ont un effet « masquant » sur certains arômes (diminution de leur intensité) et amènent plus d'amertume et de sécheresse.

Enfin, ces résultats sont en adéquation avec une récente étude sur l'impact des amines biogènes sur les vins blancs qui a montré un accroissement très marqué de l'amertume et une diminution des attributs fruités. (*P.Herr et al., 2011*).

Conclusion :

Cette étude a permis de mettre en évidence des encadrements de seuils de détection pour les quatre amines biogènes, dans deux types de matrices : une matrice hydro-alcoolique, et une matrice vin (deux blancs et deux rouges). De manière générale on a pu noter, que les amines biogènes (pures ou en mélange) étaient perçues à une concentration plus faible au niveau gustatif qu'olfactif.

Dans un premier temps, les tests ont été effectués pour les amines biogènes isolées. On constate une grande disparité des seuils selon les matrices. En effet dans la matrice hydro-alcoolique, ils sont compris entre **4 et 24 mg.L^{-1}**, alors que dans les vins ils sont supérieurs à **100 mg.L^{-1}**.

Dans un deuxième temps, le travail réalisé sur le mélange des amines biogènes a conduit à retenir un seuil entre **15 et 20 mg.L^{-1}** en matrice hydro-alcoolique, contre un seuil proche de **80 mg.L^{-1}** dans les vins. L'effet matrice est donc aussi net pour les amines biogènes en mélange.

La comparaison des seuils obtenus pour les amines biogènes pures et pour les mélanges montre que le fait de passer en mélange, engendre une diminution des seuils de détection **d'environ 20 mg.L^{-1}** pour les vins. L'existence d'un phénomène de synergie entre les molécules explique ce constat.

Au sein des vins, nous n'avons pas observé d'effet cépage, mais nous avons constaté un effet couleur : les seuils de détection pour les vins rouges sont supérieurs à ceux des vins blancs (facteur de **1,5** entre les deux).

Enfin, nous avons mis en avant que l'ajout d'amine volatile (phényléthylamine) diminue les seuils de détection olfactifs. Ce résultat peut laisser supposer qu'un mélange de l'ensemble de toutes les amines biogènes présentes dans les vins aurait un seuil de détection encore plus bas.

La complexité des interactions entre les molécules présentes dans le vin, constitue le principal facteur responsable de la difficulté à établir des seuils de détection précis dans ce type de matrice.

Par ailleurs, lorsqu'on effectue une analyse du profil sensoriel des vins additionnés d'amines biogènes (à la concentration égale au seuil de détection), on note un effet « masquant », plus qu'une odeur ou saveur désagréable.

Nous avons donc montré que pour des concentrations élevées, et bien supérieures aux valeurs généralement trouvées dans les vins, les amines biogènes influencent la qualité sensorielle de manière négative. En outre, les problèmes de toxicité de ces molécules sont accrus en milieu alcoolique et justifient l'adoption de stratégies préventives pour éviter une formation massive d'amines biogènes.

Remerciements
Les auteurs remercient Aurore Dupiot, Aurélie Abric et les œnologues de l'ICV pour leur participation à ce projet.

Bibliographie :

Analyse sensorielle, 7ème édition, recueil de normes agroalimentaires AFNOR
- ISO 11035
- ISO 13301
- ISO 09-002
- ISO 11056

-Ancín-Azpilicueta C, González-Marco A, Jiménez-Moreno N (2008) *Current knowledge about the presence of amines in wine*, Crit rev food Sci Nutr, **48**:257-75.

-Aréna, M.E. & Manca de Nadra, M.C (2001). *Biogenic amine production by Lactobacillus*, J. Appl. Microbiol. **90**:158-162.

-M. Coton, A. Romano, G. Spano, K. Ziegler, C. Vetrana, C. Desmarais, A. Lonvaud-Funel, P. Lucas, E. Coton. 2010. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. Food Microbiology, Volume 27, Issue 8, December 2010, Pages 1078-1085.

-Garcia-Marino,M. Trigueros,A. Escribano-Bailon,T., *Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines*, Journal of Food Composition and Analysis, **23**:455-462.

-Granès,D. Pic,L. Negrel,J. Bonnefond.C (2009) *L'Analyse Sensorielle Descriptive Quantifiée : une méthode pour un langage commun*, revue Française d'oenologie, **238** :16-21.

-Herr,P. Sommer,S. Fisher.U (2011) *Réduction de la teneur en amines biogènes avec de la bentonite*, La Revue des OEnologues, **140** : 19-21.

-Lehtonen, P., Saarinen, M.,Vesanto, M., and Riekkola, M. L. (1992) *Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatisation with o-phtahaldehyde and fluorescence detection*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **194**:434–437.

-Palamand S.R, and W.A Hardwick (1969), *Studies on the relative flavor importance of some beer constituants*, Technical Quaterly, Master association of America, **6**, 117-128.

-Silla-Santos, M. H. (1996) *Biogenic amines: their importance in foods*. *Int. J.Food Microbiol,* **29**:213–231.

-Smith A.Y, W.J du Toit and M. du Toit (2008) *Biogenic amines in wine: understanding the headache*, S. Afr. J.enol. Vitic, **9**:No.2.

-Soufleros, E., Barrios, M. L., and Bertrand, A. (1998). *Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds*. *Am. J. Enol. Vitic,* **49**:266–278.

-Woller.R (2005) *Aminas biogenas : pesencia en el vino y efectos en el organismo*, *ACE revista de enologia,* **54.**