

LES ACIDES GRAS ESTÉRIFIÉS, LES STÉROLS ET LE SQUALÈNE DES ENVELOPPES CELLULAIRES DE LEVURE

K. BERNATH* et A. BERTRAND**

*Kantonales Laboratorium, Ferhstrasse 15, 8032 ZURICH (Suisse)

**Université de Bordeaux 2, UFR Institut d'Œnologie,
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

INTRODUCTION

L'addition d'enveloppes cellulaires ou « écorces » de levure au moût de raisins peut favoriser les fermentations alcoolique et malolactique (LARUE *et al.*, 1984; LONVAUD-FUNEL *et al.*, 1985). Ce phénomène peut s'expliquer par une adsorption de certains acides gras du milieu qui sont des substances inhibitrices mais également par une libération dans le milieu en fermentation « d'activateurs » issus des écorces de levure. En effet, BERTRAND et MIELE, (1984) ont démontré que 100 mg d'écorces de levure macérées dans une solution aqueuse cèdent 7,3 mg d'acides gras totaux. On peut supposer que les stérols et le squalène, s'ils sont présents, peuvent également diffuser dans le milieu liquide environnant.

Les vins ne contiennent pas de grandes quantités de lipides (BERTRAND et SOUFLEROS, 1988), de même, ils sont pauvres en stérols (GUILLOUX-BENATIER *et al.*, 1989). En fermentation, dans des conditions de semi-anaérobiose, la concentration en stérols et acides gras insaturés dans la levure est beaucoup plus importante au début de la fermentation alcoolique qu'à la fin, ce qui a comme conséquence pour elles une survie limitée dans un milieu sans oxygène et riche en alcool (LARUE *et al.*, 1989) Par ailleurs, la levure peut assimiler les acides gras et les stérols du milieu de fermentation. On comprend donc l'intérêt de l'apport de tels éléments pour favoriser la croissance des microorganismes du vin ou bien leur survie.

Plus particulièrement, le rôle joué par les écorces de levure laisse supposer que ces dernières ne sont pas seulement riches en acides gras mais aussi en stérols et en squalène.

Ce travail se propose de doser les acides gras estérifiés, les stérols et le squalène dans deux échantillons d'écorces de levure du commerce de marques différentes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les échantillons du commerce qui ont été analysés sont produits respectivement par FOULD SPRINGER (94701 Maison-Alfort, France) et HEFACELL (distribué par ERBSLOEH, Allemagne).

L' extraction est réalisée par broyage des enveloppes cellulaires de levure avec des billes de verre de 0,4 mm de diamètre en présence du mélange dichlorométhane-méthanol (2:1, V/V). Le broyage est obtenu à l'aide d'un appareil Vortex en deux heures; ce broyage est répété deux fois. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'une extraction par trempage avec agitation des écorces (40 mg) dans 5 ml d'éther éthylique durant 30 minutes.

I — PRÉPARATION DE L'EXTRAIT POUR LE DOSAGE DES STÉROLS TOTAUX ET DU SQUALÈNE

La moitié de l'extrait est évaporée à sec à la température ambiante et sous vide. Par la suite, ce résidu est saponifié à la température de 90°C, pendant 60 minutes, à l'aide de 2ml de KOH 2N en solution dans le méthanol. Ensuite, les stérols totaux sont extraits par deux ml d' hexane, à trois reprises. La phase organique est évaporée à sec sous vide partiel, à 35°C.

La formation de dérivés volatilisables des stérols est réalisée par addition au résidu sec de 50 µl d' agent de silylation (Hexaméthylidisilazane, Triméthylchlorosilane, Pyridine, 3:1:9, v/v/v) la réaction s'effectue à 40 °C pendant 20 minutes. Enfin, après avoir ajouté 1 ml d' eau au mélange, les stérols silylés sont extraits par 2 ml d' Hexane.

II — PRÉPARATION DE L'EXTRAIT POUR LE DOSAGE DES ACIDES GRAS ESTÉRIFIÉS

La moitié de l' extrait est évaporée à sec, sous vide, à température ambiante. La transestérification est réalisée par ajout d'un ml de méthylate de sodium à 1% en solution dans le méthanol. La réaction s'effectue à 60 °C, pendant 20 minutes. Après avoir ajouté un ml d' eau au mélange, les esters méthyliques d' acides gras sont extraits à deux reprises par un ml d' Hexane.

Pour les esters méthyliques d'acides gras, l'analyse chromatographique (figure 1) est effectuée, à l' aide d' une colonne capillaire en verre de Carbowax 20 M (0,32 mm x 30 m; épaisseur de la phase : 0,25 µm). L' injection de un µl se fait « on column » à 60°C. La température du four est programmée de 60°C à 130° C à raison de 10 °C par minute et de 130°C à 190°C à raison de 3°C par minute.

L' étalon interne est le nonadécanoate de méthyle.

Pour les stérols triméthylsilylés (figure 2), l'analyse chromatographique est réalisée grâce à une colonne capillaire en verre; la phase stationnaire est du PS 255 (0,32 mm x 20 m, épaisseur de la phase 0,15 µm). L' injection de un µl se fait « on column » à 60°C. La température du four est programmée de 60°C à 250°C à raison de 30 °C par minute, de 250°C à 290°C à raison de 3°C par minute.

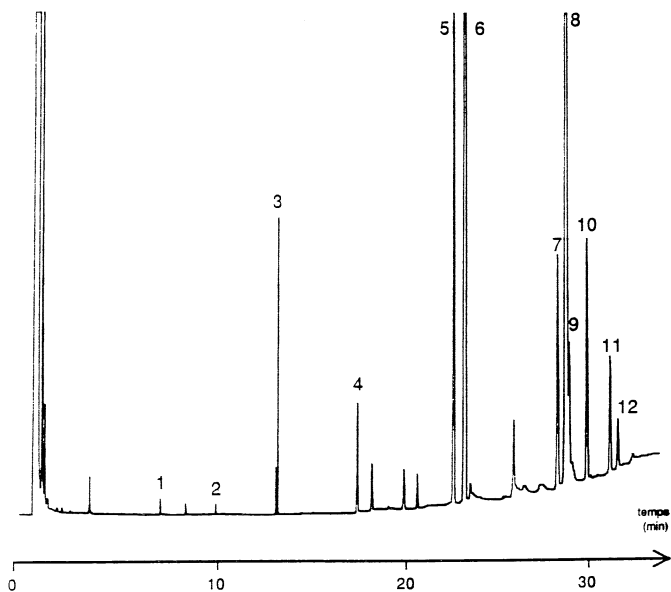


Fig. 1 — Esters méthyliques des acides gras transestérifiés d'un échantillon d'écorces de levure.

1 : acide caprylique (C 8 : 0); 2 : acide caprique (C 10 : 0); 3 : acide laurique (C 12 : 0); 4 : acide myristique (C 14 : 0); 5 : acide palmitique (C 16 : 0); acide palmitoléique (C 16 : 1); 7 : acide stéarique (C 18 : 0); acide oléique (C 18 : 1 Ω 9 cis); 9 : (C 18 : Ω 7 cis); 10 : acide linoléique (C 18 : 2); 11 : acide nonadécanoïque (C 19 : 0), (étalon interne); 12 : acide linoléique (18 : 3).

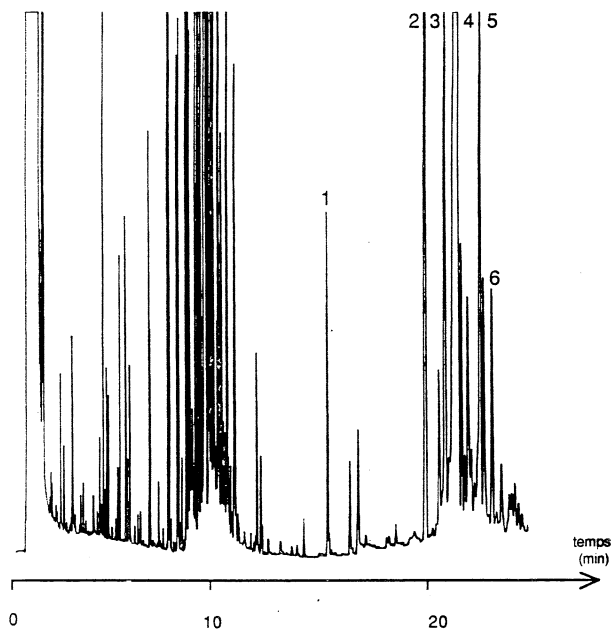


Fig. 2 — Stérols totaux silylés et squalène d'un échantillon d'écorces de levure.

1 : squalène; 2 : cholestérol (étalon interne); 3 : zymostérol; 4 : ergostérol; 5 : stigmastérol; 6 : lanostérol.

L' étalon interne est le cholestérol.

Pour les deux colonnes capillaires, le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène et les pressions sont réglées de manière à ce que la vitesse du gaz dans la colonne à température ambiante soit de 50 cm par seconde.

Remarque : On peut constater que le pic de l' ergostérol est plus large que celui des autres stérols, cet élargissement du pic est dû à une dégradation partielle de l' ergostérol dans la colonne en raison de la température élevée nécessaire à l'analyse; ce phénomène est diminué par la silylation et par l'utilisation d'une colonne apolaire ayant une épaisseur de phase faible ce qui permet aux stérols d'être élués de la colonne à une température plus basse.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La fiabilité du dosage est bonne (tableaux I et II). Pour les stérols et le squalène, le coefficient de variation est toujours au-dessous de 10%. Pour les acides gras estérifiés le coefficient de variation est au dessous de 10% à l' exception de l' acide tétradécanoïque.

TABLEAU I

**Répétabilité des dosages du squalène et des stérols
de deux échantillons d'écorces de levure (mg/100 mg d'écorces de levure)**

	Squalène	Zymostérol	Ergostérol	Stigmastérol	Lanostérol
HEFACELL 1	0,081	0,488	1,478	0,340	0,164
HEFACELL 2	0,077	0,446	1,410	0,343	0,136
HEFACELL 3	0,087	0,490	1,518	0,358	0,148
FOULD-SPRINGER 4	0,063	0,322	0,190	0,312	0,118
FOULD-SPRINGER 5	0,057	0,314	0,166	0,308	0,111
FOULD-SPRINGER 6	0,068	0,335	0,181	0,317	0,119
Écart type (n-1) 1-3	0,005	0,025	0,055	0,008	0,014
Écart type (n-1) 4-6	0,005	0,011	0,012	0,004	0,004
Coef. de variation (%) (n-1) 1-3	6,326	5,230	3,711	243	9,460
Coef. de variation (%) (n-1) 4-6	8,418	3,312	6,674	1,416	3,567

TABLEAU II

Répétabilité des dosages des acides gras transestérifiés de deux échantillons d'écorces de levure de marques différentes (mg/100 mg d'écorces de levure)

	C10:0	C 12:0	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1 Ω 9 et 7 cis	C 18:2	C 18:3	Total
HEFACELL 1	0,008	0,038	0,137	1,027	3,962	0,326	3,874	0,546	0,146	10,064
HEFACELL 2	0,008	0,036	0,149	0,955	3,655	1,301	3,702	0,520	0,143	9,468
HEFACELL 3	0,008	0,040	0,102	1,015	3,998	0,328	4,055	0,555	0,150	10,251
FOULD-SPRINGER 4	0,006	0,030	1,188	1,411	4,463	0,447	4,867	0,960	0,282	12,654
FOULD-SPRINGER 5	0,006	0,027	0,154	1,287	4,060	0,434	4,643	0,912	0,271	11,794
FOULD-SPRINGER 6	0,006	0,025	0,197	1,281	3,910	0,448	4,647	0,907	0,269	11,690
Moyenne 1-3	0,008	0,038	0,129	0,999	3,872	0,318	3,877	0,540	0,146	9,928
Moyenne 4-6	0,006	0,027	0,180	1,326	4,144	0,443	4,719	0,926	0,274	12,046
Écart type (n-1) 1-3	0,000	0,002	0,024	0,039	0,189	0,015	0,177	0,018	0,004	0,333
Écart type (n-1) 4-6	0,000	0,003	0,023	0,073	0,286	0,008	0,128	0,029	0,007	0,529
Coefficient de variation % (n-1) 1-3	0,000	5,263	18,881	3,861	4,869	4,726	4,553	3,364	2,400	3,358
Coefficient de variation % (n-1) 1-3	0,000	9,207	12,623	5,533	6,901	1,763	2,716	3,159	2,555	4,392

TABLEAU III

Comparaison de deux méthodes sur les teneurs en squalène et en stérols de deux préparations d'écorces de levures (en mg pour 100 mg d'écorces de levure)

	HEFACELL		FOULD-SPRINGER	
	Méthode d'extraction		Méthode d'extraction	
	proposée*	lavage à l'éther	proposée*	lavage à l'éther
Squalène	0,082	—	0,063	—
Zymostérol	0,475	0,012	0,324	0,012
Ergostérol	1,469	0,373	0,179	0,079
Stigmastérol	0,337	0,002	0,312	0,003
Lanostérol	0,149	non déterminé	0,116	non déterminé
Stérols totaux	2,430	0,387	0,931	0,094

* Les résultats représentent la moyenne de trois dosages.

TABLEAU IV

Comparaison de deux méthodes sur les teneurs en acides gras transestérifiés de deux préparations d'écorces de levures (en mg pour 100 mg d'écorces de levure)

	HEFACELL		FOULD-SPRINGER	
	Méthode d'extraction		Méthode d'extraction	
	proposée*	lavage à l'éther	proposée*	lavage à l'éther
C 10 : 0	0,008	—	0,006	—
C 12 : 0	0,038	—	0,028	—
C 14 : 0	0,129	—	0,180	—
C 16 : 0	0,999	0,031	1,326	0,019
C 16 : 1	3,872	0,039	4,144	0,083
C 18 : 0	0,318	0,010	0,443	0,005
C 18 : 1	3,877	0,015	4,719	0,074
Ω 9 et 7 cis				
C 18 : 2	0,541	0,018	0,926	0,012
C 18 : 3	0,147	0,015	0,274	0,002
Total	9,929	0,129	12,046	0,195

* Les résultats représentent la moyenne de trois dosages.

L'extraction des stérols et des acides gras estérifiés par simple lavage des écorces de levure dans un solvant organique est beaucoup moins efficace que le mode d' extraction proposé; il y a quelquefois un facteur 10 entre les résultats des deux méthodes (tableaux III)

Les concentrations en stérols et en squalène des deux produits analysés (tableau III) montrent que le produit HEFACELL est plus riche en ergostérol que le produit FOULD-SPRINGER. Les concentrations totales en stérols sont comparables à celles trouvées dans les levures sèches actives de vinification. (LARUE, 1978).

Les deux acides gras estérifiés principaux, dans les deux produits, sont les acides oléique (18:1) et palmitoléique (16:1), (tableau IV); ceci correspond aux résultats de BERTRAND et SOUFLEROS (1984), bien que les concentrations soient plus importantes que celles signalées dans le travail cité en référence et pour lequel la macération des écorces de levure se fait en milieu aqueux. Il est à noter la présence importante de l'acide linoléique (18:3) qui pourrait bien être une sorte de marqueur de l'utilisation des écorces de levure; en effet, selon BERTRAND et MIELE (1989) cet acide est pratiquement absent dans le vin n'ayant pas reçu d'écorces de levures, il peut atteindre 0,2 mg/l dans le cas de leur utilisation. Ces résultats montrent que les écorces de levure apportent au milieu des acides gras et des stérols, composés essentiels pour assurer la viabilité des microorganismes du vin.

CONCLUSION

La méthode proposée permet de doser les acides gras estérifiés, le squalène et les stérols totaux des écorces de levures. Les taux de ces diverses substances varient selon les produits.

Les écorces de levures présentent une teneur importante en stérols, squalène et en acides gras estérifiés. On peut supposer que ces substances sont libérées par les écorces et servent d'activateurs pour les levures et les bactéries lactiques.

Note reçue le 1^{er} octobre 1991.

Remerciement :

Les recherches ont pu être réalisées grâce au concours du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND A. et MIELE A.,1984. Influence de la clarification du moût de raisin sur sa teneur en acides gras. *Connaiss. Vigne Vin*, **18**, n°4, 293-297.

- BERTRAND A. et SOUFLEROS E., 1988. Les acides gras libres du vin, observations sur leur origine. *Connaiss. Vigne Vin*, **22**, n°4, 251- 259.
- GUILLOUX-BENATIER M., LE FUR Y. et FEUILLAT M., 1989. Influence de la macération pelliculaire sur la fermentescibilité malolactique des vins blancs de Bourgogne. *Rev. Fr. Oenol.*, **121**, 29-34.
- LONVAUD-FUNEL A., DESSENS C. et JOYEUX A., 1985. Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levures et de différents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Connaiss. Vigne Vin*, **19**, n°4, 229-240.
- LARUE F., 1978. Les facteurs de survie de la levure et leur rôle sur la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Thèse Docteur en Œnologie-Ampélogie*. Université de Bordeaux II
- LARUE F., GENEIX C., LAFON-LAFOURCADE S., BERTRAND A. et RIBEREAU-GAYON P., 1984. Premières observations sur le mode d'action des écorces de levure. *Connaiss. Vigne Vin*, **18**, n°3, 155-163.
- LARUE F., ROZES N., DOIGNON F. et FOHR L., 1989. Relation entre le métabolisme lipidique et l'activité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* dans le moût de raisin. *Actualités Œnologiques. 4^e Symposium International d'Œnologie*, Bordeaux.
- RADLER F., 1977. Les activateurs de développement anaérobie de la levure. *3^e Symposium International d'Œnologie*, Bordeaux.