

INCIDENCE DE CERTAINS POLYSACCHARIDES INSOLUBLES SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Françoise LARUE, Catherine GENEIX, Min-Kyung PARK, Yasuo MURAKAMI,
Suzanne LAFON-LAFOURCADE* et P. RIBÉREAU-GAYON.

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II,
*Institut National de la Recherche Agronomique
351, Cours de la Libération, 33405 Talence Cédex (France)

INTRODUCTION

Les enveloppes cellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* ou « écorces de levure » stimulent la fermentation alcoolique du moût de raisin (GENEIX et *al.*, 1983b). Cette propriété repose en particulier sur leur capacité à adsorber certains acides gras et esters éthyliques formés par la levure au cours de la croissance, lesquels deviennent inhibiteurs en synergie avec l'éthanol (GENEIX et *al.*, 1983a). Cependant, des écorces ajoutées au moût en fermentation ne modifient pas significativement la composition du vin ; leur effet s'exerce surtout, de manière apparente, au niveau des levures vivantes qu'elles débarrassent des substances inhibitrices fixées pariétalement (LARUE et *al.*, 1984).

Les écorces de levure contiennent, en moyenne 18 p. 100 de protéines, 18 p. 100 de matières grasses et 55 p. 100 de polysaccharides, essentiellement localisés dans les parois.

Des observations préalables effectuées par D. DUBOURDIEU (Institut d'Œnologie de Bordeaux) laissaient supposer que la capacité adsorbante des écorces repose essentiellement sur certains polysaccharides pariétaux.

Dans ce travail on a cherché à préciser les propriétés stimulantes de fractions isolées des écorces de levure.

Les résultats nous ont conduit à expérimenter l'action des polysaccharides insolubles, plus particulièrement des celluloses d'origines diverses.

MATERIELS ET METHODES

Techniques microbiologiques

Le moût de raisin (Muscat, Salins du Midi, 34063 Montpellier) amené à pH 3,5, est enrichi en sucre par addition de saccharose.

La levure est une souche commerciale de *S. cerevisiae* (levure sèche active, Gist-Brocades, 59472 Seclin).

Les fermentations sont conduites dans des flacons de 375 ml contenant 300 ml de milieu, à 25 °C, en semi-aérobiose.

Les écorces de levure proviennent d'une préparation industrielle (Fould-Springer, 94707 Maisons-Alfort).

Les différentes fractions des écorces de levure ont été isolées par D. DUBOURDIEU selon la technique de FLEET et MANNERS (1978) : (1) écorces débarrassées des mannoprotéines ; (2) β (1 \rightarrow 3) glucane fibreux ; (3) β (1 \rightarrow 3) glucane amorphe. La poudre de cellulose (Clarcel 13-6, CECA, 78141 Villacoublay) est celle utilisée pour les opérations de filtration du vin. Des celluloses de diverses origines ont été fournies par l'Institut du Pin de l'Université de Bordeaux I.

Les populations totales sont dénombrées au compte-globules Malassez. Les populations viables sont déterminées par numération des colonies formées en milieu nutritif solide (moût de raisin contenant 160 g de sucre par litre, dilué deux fois et amené à pH 3,5 puis additionné de gélose à la dose de 20 g par litre).

Méthodes chimiques

Les sucres sont dosés par méthode chimique (RIBÉREAU-GAYON et al., 1983).

Les acides gras et les esters sont dosés par chromatographie en phase gazeuse (BERTRAND, 1975 ; TORRES-ALEGRE, 1982).

RESULTATS

I — INCIDENCE, A L'EGARD DE LA STIMULATION DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE, DE DIFFERENTES FRACTIONS DES ECORCES DE LEVURE.

Les fractions 1, 2, 3 et des écorces de levure, sont ajoutées (0,2 et 0,5 g/l) dans le moût parfaitement clarifié, enrichi à 260 g de sucre par litre, au moment de l'ensemencement avec *S. cerevisiae*. A l'arrêt des fermentations (Tableau I) la quantité de sucre fermenté est, dans toutes les conditions, supérieure à celle du moût témoin ; elle est maximale dans le moût fermenté en présence de la fraction (1) qui correspond aux écorces débarrassées des mannoprotéines, et voisines de celle du moût additionné d'écorces de levure.

D'un autre côté, on observe que, conservées à l'air à température ambiante, les écorces de levure prennent une odeur de rance ; simultanément, le matériau oxydé perd de son activité (Tableau II).

II — CAPACITE ADSORBANTE DE LA POUDDRE DE CELLULOSE ; INCIDENCE A L'EGARD DE LA STIMULATION DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.

La capacité adsorbante des écorces de levure semble liée principalement à leur composition en glucanes. En conséquence, nous avons recherché si un autre polysaccharide, la cellulose, possède cette propriété.

TABLEAU I

Incidence de l'addition au moût de différentes fractions des écorces industrielles à l'égard de la stimulation de la fermentation.

Sucre initial : 260 g/l. Levure : *S. cerevisiae* (LSA)

		Sucre fermenté (g/l)
Témoin		186
Ecorces de levure	0,2 g/l	245
	0,5 g/l	245
Fraction (1) Ecorces moins mannoprotéines	0,2 g/l	250
	0,5 g/l	250
Fraction (2) Glucane fibreux	0,2 g/l	216
	0,5 g/l	215
Fraction (3) Glucane amorphe	0,2 g/l	216
	0,5 g/l	223

TABLEAU II

Stimulation de la fermentation du moût de raisin en présence d'écorces de levure conservées sous vide et à l'air.

Sucre : 260 g/l. Levure : *S. cerevisiae* (LSA) ;
ensemencement : 10^6 cell/ml.

Température : 25° C ; Poids d'écorces : 0,2 g/l.

Qualité des écorces ajoutées après 1 jour de fermentation	Temps en jour			
	4	7	14	32
Témoin non additionné d'écorces	60	105	157	188
Ecorces conservées sous vide	78	165	222	234
Ecorces conservées au contact de l'air	72	142	206	224

Les chiffres expriment le sucre fermenté en g/l.

TABLEAU III

Adsorption des certains acides gras et de leurs esters éthyliques par les écorces de levure et par la poudre de cellulose.

	Ecorces de levure (0,5 g/l)	Poudre de cellulose	
		(0,5 g/l)	(1,0 g/l)
ACIDES			
hexanoïque	0	0	0
octanoïque	0	0	0
décanoïque	36	9	9
dodécanoïque	99	40	40
ESTERS ETHYLIQUES DES ACIDES			
octanoïque	54	25	35
décanoïque	86	20	66
dodécanoïque	99	99	99

Les chiffres indiquent le pourcentage de chaque substance adsorbée après 24 heures de contact.

On a préparé un milieu synthétique calme contenant par litre : acide hexanoïque 6 mg ; acide octanoïque 10 mg ; acide décanoïque 3 mg ; acide dodécanoïque 1 mg ; hexanoate, octanoate, décanoate, dodécanoate d'éthyle 0,5 mg chacun. Il est additionné par litre de 0,5 g d'écorces de levure, de 0,5 g ou de 1 g de poudre de cellulose utilisée pour la filtration des vins. Après 24 heures, on dose les acides gras et les esters dans le liquide surnageant. Les résultats obtenus (Tableau III) montrent que la capacité adsorbante de la cellulose est nettement inférieure à celle des écorces de levure ; elle s'exerce principalement sur l'acide dodécanoïque et les esters éthyliques des acides octanoïque, décanoïque et dodécanoïque.

Dans le moût de raisin parfaitement clarifié, enrichi à 260 g de sucre par litre, on a ajouté des écorces de levure et de la poudre de cellulose aux doses de 0,2 et 0,4 g par litre, avant fermentation et après la fermentation des premiers 50 g de sucre (Tableau IV). L'addition d'écorces est la plus efficace lorsqu'elle est effectuée après la fermentation des premiers 50 g de sucre. La population totale est pratiquement doublée, quel que soit le moment de l'addition, et la population viable en fin de fermentation 3 à 6 fois plus importante que dans le moût témoin. Ces observations confirment des résultats antérieurs (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1984).

TABLEAU IV

Stimulation de la fermentation par addition d'écorces de levure et de cellulose.

Résultats à l'arrêt spontané des fermentations

Moût de raisin

Sucre initial : 260 g/l.

Moment de l'addition	Avant fermentation				Après fermentation de 50 g/l de sucre			
	Ecorces	Cellulose	Ecorces	Cellulose	Ecorces	Cellulose	Ecorces	Cellulose
Activateur (g/l)	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4
Sucre fermenté (g/l)	180	229	218	220	256	256	214	213
Population viable cells x 10 ⁷ /ml	0,16	0,53	0,22	0,30	0,86	1	0,28	0,31
Population totale cells x 10 ⁷ /ml	2,80	5,60	4,00	4,10	4,70	6,10	3,20	3,20

TABLEAU V

Stimulation de la fermentation alcoolique par addition aux moûts de celluloses d'origines diverses.

Résultats à l'arrêt spontané des fermentations

Moût de raisin

Sucre initial : 260 g/l.

	Ecorces de levure		1		2		3		4		5		6		
Activateurs (g/l)	0	0,2	0,4	0,2	0,4	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
Sucre fermenté (g/l)	180	246	257	220	222	210	223	220	210	202	205	226	234	203	218
Population viable cells x 10 ⁷ /ml	0,11	1,17	1,86	0,18	0,20	0,14	0,13	0,11	0,11	0,14	0,18	0,11	0,11	0,11	0,15
Population totale cells x 10 ⁷ /ml	2,46	3,13	4,13	2,80	2,70	2,69	2,20	3,01	2,80	2,31	2,35	2,58	2,14	2,72	2,14

L'origine des celluloses et leur qualité est la suivante : (1) poudre de cellulose CECA ; (2) bouleau, blanche ; (3) résineux finlandais, blanche ; (4) résineux, écrue ; (5) eucalyptus, blanche ; (6) pin maritime, blanche.

Les chiffres expriment le sucre fermenté en g/l.

TABLEAU VI

Stimulation de la fermentation alcoolique de moûts contenant des pesticides par addition d'écorces de levure et de poudre de cellulose.

Moût de raisin

Sucre initial : 220 g/l.

Résultats après 48 jours d'incubation à 25° C.

Pesticides	Euparène (19 mg/l)				Mycodifol (10 mg/l)				Mikal (6 mg/l)								
	0	0,2	0,5	Cellulose* 0,2	0	0,2	0,5	Cellulose 0,2	0	0,2	0,5	Cellulose 0,2	0	0,2	0,5	Cellulose 0,2	
Traitement (g/l)	0	190	207	206	0	157	188	0	152	182	206	0	204	206	206	206	
Sucre fermenté (g/l)	182																
Population viable cells x 10 ⁷ /ml	0,04	0,12	0,19	0,07	0	0,36	0,24	0	0,23	0,32	0,34	0	0,07	0,21			
Population totale cells x 10 ⁷ /ml	3,68	5,12	6,8	4,95	0	3,38	5,09	0	2,62	4,09	6,53	0	4,74	5,1			

* Poudre de cellulose Clarcel 13-6, CECA, 78148 Villacoublay.

Les chiffres expriment le sucre fermenté en g/l.

La poudre de cellulose stimule la fermentation. Elle est la plus efficace lorsqu'elle est ajoutée avant le départ en fermentation et la dose de 0,2 g par litre est suffisante. Dans cet exemple, elle permet la dégradation de 84 p. 100 du sucre au lieu de 69 p. 100 dans le témoin, mais 98,5 p. 100 sont fermentés en présence d'écorces. En fin de fermentation, dans le moût additionné de cellulose, la population totale des levures est augmentée, la population viable également, mais dans des proportions nettement inférieures à celles qui découlent de la présence des écorces de levure (Tableau IV).

Dans un autre essai, des celluloses d'origines diverses ont été expérimentées comparativement à la poudre de cellulose et aux écorces de levure (Tableau V). Aux doses utilisées, la cellulose extraite de l'eucalyptus exerce une stimulation légèrement supérieure à la poudre de cellulose ; les autres sont moins actives. Les écorces de levure demeurent beaucoup plus efficaces.

Dans une autre expérience, un moût est additionné de produits chimiques utilisés pour la protection de la vigne (Tableau VI) ; les deux activateurs, à la dose de 0,5 g par litre, stimulent de la même manière la fermentation en présence d'Euparène et de Mikal ; à la dose de 0,2 g par litre, la cellulose utilisée pour la filtration des vins est plus active. Le Mycodifol à la concentration de 10 mg par litre interdit toute fermentation ; 0,2 g par litre d'écorces permettent la fermentation de 74 p. 100 du sucre ; à la dose de 0,5 g par litre la cellulose permet une fermentation plus complète. Dans ce cas la cellulose est aussi efficace que les écorces de levure.

TABLEAU VII

Stimulation de la refermentation d'un vin en arrêt de fermentation par traitement aux écorces de levure et à la poudre de cellulose.

Vin
 Titre alcoométrique : 11 % vol.
 Sucre : 20 g/l.

Température : 25° C
 Inoculation : 10⁶ cell/ml
 Levure : *S. cerevisiae*

	Témoin	Ecorces de levure		Cellulose*	
		(0,4 g/l)	(1 g/l)	(0,4 g/l)	(1 g/l)
16ème jour	17	14	14	16	17
19ème jour	13	9	8	11	14
21ème jour	11	7	5	8	10
24ème jour		2	< 1,5	4	5
28ème jour	3,85	1,5	< 1,5	< 1,5	< 1,5

* Poudre de cellulose Clarcel 13-6, CECA, 78148 Villacoublay.

Les chiffres expriment le sucre fermenté en g/l.

TABLEAU VIII

Stimulation de la fermentation alcoolique du moût par certains additifs.

Résultat à l'arrêt spontané des fermentations

Moût de raisin

Sucre initial : 260 g/l

	1		2		3		4		5		6		7		
Activateurs (g/l)	0	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5
Sucre fermenté (g/l)	180	246	255	187	185	186	180	226	223	218	212	221	220	206	208

Les chiffres expriment le sucre fermenté en g/l.

(1) écorces de levure ; (2) gel de silice (BLANKASIT - ERBSLOH, GEISENHEIM); (3) solution de silice (BAYKISOL, BAYER) ; (4) caséine soluble ; (5) alginat GS 500 (CELA-SA, LANNILIS); (6) gélose ; (7) microbilles de verre.

Enfin, dans un vin en arrêt de fermentation titrant 11,5 p. 100 d'éthanol et 20 g par litre de saccharose, un ensemencement avec 10^6 cell/ml de *S. cerevisiae* a induit la refermentation (Tableau VII) ; mais on observe, après 20 jours, un nouvel arrêt, laissant 3,85 g par litre de sucre résiduel. En présence des activateurs, la dégradation du sucre est complète, un peu plus rapide en présence d'écorces de levure que de cellulose.

D'autres substances, de nature polysaccharides ou non, ont été expérimentées. L'addition au moût avant fermentation de microbilles de verre, de caséine soluble, de certains alginates, de gélose, à la dose de 0,2 et 0,5 g/l, stimulent la dégradation du sucre, sensiblement au même titre que la cellulose et les glucanes des parois de levure (Tableau VIII). La bentonite, les gels et solutions de silice demeurent pratiquement sans effet.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce travail permet de dégager un certain nombre d'informations originales.

En ce qui concerne les écorces de levure : a) bien que leur capacité adsorbante soit essentiellement liée à leurs constituants polysaccharidiques, le matériau brut et la fraction la plus complexe (écorces débarrassées ou non des mannoprotéines) sont les plus activateurs ; b) la fraction la plus simple, constituée des polysaccharides est nettement moins stimulante ; c) le rancissement des écorces (facilement évitable par un conditionnement sous vide) diminue leur efficacité. Ces observations suggèrent que le mécanisme d'action des écorces, outre la fixation de certaines substances toxiques pour la levure, repose également sur d'autres phénomènes plus complexes non encore élucidés. La partie protéique n'intervient pas. Par contre, la partie lipidique pourrait être active. Ce point est actuellement à l'étude.

D'un autre côté, la poudre de cellulose utilisée pour les opérations de filtration présente effectivement des propriétés adsorbantes vis-à-vis d'un acide gras inhibiteur (acide dodécanoïque) et de certains esters éthyliques. A notre connaissance, c'est la première fois que ce phénomène est rapporté. Ces propriétés sont nettement inférieures à celles des écorces de levure, ce qui explique déjà en partie la moindre efficacité de la cellulose à l'égard de la stimulation de la fermentation. Néanmoins, elles doivent intervenir dans l'interprétation de la meilleure fermentescibilité des moûts blancs non débourbés, riches en polysaccharides, mais aussi dans celle de la plus faible teneur en esters des vins correspondants et également des vins rouges (TORRES-ALEGRE, 1983).

Enfin, les écorces de levure et la cellulose sont actives de même manière dans les moûts contenant certains pesticides. Le fait que l'inhibition totale de la fermentation, observée à certaines doses, soit levée en

présence de ces matériaux implique une adsorption initiale partielle de ces substances. On comprend mieux la présence, en fin de fermentation, de ces résidus de pesticides presque exclusivement dans les lies.

L'ensemble de ces résultats ouvre à la recherche concernant la stimulation de la fermentation une voie d'investigation nouvelle. La cellulose, bien que moins active que les écorces, serait suffisante dans certaines conditions. D'autres polysaccharides insolubles pourraient trouver une utilisation œnologique.

Remerciements. Nous remercions D. DUBOURDIEU qui a préparé les différentes fractions des écorces de levure et l'Institut du Pin de l'Université de Bordeaux I qui nous a fourni gracieusement diverses préparations de cellulose. Nous remercions également le Prof. A. BERTRAND pour son aide dans les dosages par chromatographie en phase gazeuse.

Manuscrit reçu le 7 janvier 1985 ; accepté pour publication le 11 février 1985.

RÉSUMÉ

La stimulation de la fermentation alcoolique par les écorces de levure est liée en particulier à la constitution polysaccharidique de ce matériau. Un polysaccharide couramment utilisé en œnologie, la cellulose, possède également la capacité d'adsorber certaines substances inhibitrices et, en conséquence, présente des propriétés activatrices ; celles-ci sont néanmoins inférieures à celles des écorces de levure.

SUMMARY

Alcoholic fermentation stimulation by yeast ghost is particularly linked to its polysaccharide composition. Cellulose, a polysaccharide often used in enology can also adsorb some fermentation inhibitors and consequently has some activating properties but less than that of the yeast ghosts.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Stimulierung der alkoholischen Gärung durch Heferinden ist insbesondere an die polysaccharidische Zusammensetzung der Rinden gebunden. Ein in der Onologie geläufiges Polysaccharid, die Zellulose, besitzt ebenfalls die Fähigkeit, gewisse Hemmsubstanzen zu adsorbieren und wirkt deshalb auch reaktivierend. Diese Wirkung liegt allerdings unter derjenigen der Heferinden.

RESUMEN

El papel activador de las cortezas celulares de levaduras durante la fermentación alcohólica es debido, por parte, a compuestos osídicos presentes en dichas cortezas.

Si se utiliza celulosa en vez de cortezas se observe un efecto casi semejante en los mostos. No obstante, aún parece mejor añadir cortezas porque adsorben más algunos inhibidores de la fermentación.

RIASSUNTO

La stimolazione della fermentazione alcolica dalle scorze di lieviti è legata specialmente alla costituzione polisaccaridica di questo materiale. Un polisaccaride utilizzato spesso in enologia, la cellulosa, ha anche la capacità di adsorbire certe sostanze inibitori e presentano per conseguenza, caratteristiche attinenti; queste sono tuttavia inferiori a quelle delle scorze di lievito.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTRAND A., 1975. Recherche sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. *Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Bordeaux II.*
- GENEIX C., 1984. Recherches sur la stimulation et l'inhibition de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Bordeaux II.*
- GENEIX C., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1983a. Effet des acides gras sur la viabilité des populations de *Saccharomyces cerevisiae*. *C.R. Acad. Sc. Paris 296 série III*, 943-949.
- GENEIX C., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1983b. Les causes la prévention et le traitement des arrêts de la fermentation alcoolique. *Connaissance Vigne Vin*, **17**, N° 3, 205-217.
- FLEET G.H. et MANNERS D.J., 1977. The enzymic degradation of an alcali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of gen. Microbiol.*, **98**, 315-327.
- LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C. and RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts. Their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, N° 6, 1246-1249.
- LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Les modalités de mise en œuvre des écorces de levure en vinification. *Connaissance Vigne Vin*. **18**, N° 2, 111-125.
- LARUE F., GENEIX C., LAFON-LAFOURCADE S., BERTRAND A. et RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Premières observations sur le mode d'action des écorces de levure. *Connaissance Vigne Vin*, **18**, N° 3, 155-163.
- TORRES-ALEGRE V.M., 1982. Formation des acides gras et autres produits secondaires au cours de la vinification. Interprétation statistique des résultats. *Thèse Docteur-Ingénieur, Université de Bordeaux II.*