

ACTIVITE ANTILEVURE DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX MOLECULAIRE

P. SUDRAUD et S. CHAUVET

Avec la collaboration technique de Jeanne-Marie CAZABEIL, M. BART,
B. CREBASSA et G. ROGNON

Laboratoire Interrégional de la Répression des Fraudes de Bordeaux,
Institut d'Enologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

Si les actions antimicrobiennes et particulièrement anti-levures des différentes formes de l'anhydride sulfureux contenu dans les vins sont connues depuis de nombreuses années, les données concernant la teneur en SO_2 moléculaire nécessaire pour empêcher la refermentation des vins moelleux ou doux ne sont pas toujours très précises. En effet, RIBÉREAU-GAYON et *al*, (1977) donnent un tableau indiquant les teneurs en anhydride sulfureux libre pour entretenir dans les vins une activité antiseptique égale à celle de 2 mg de SO_2 non dissocié, c'est-à-dire moléculaire mais sans préciser si cette teneur de 2 mg par litre est suffisante pour assurer une bonne stabilité microbiologique ; dans son exposé à l'Office International de la Vigne et du Vin, sur les problèmes de l'anhydride sulfureux, BEECH et *al*, (1979) citant les travaux de MACRIS et MARKAKIS (1974) indique bien que l'action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux, vis-à-vis des levures est en rapport linéaire avec la concentration en SO_2 moléculaire mais sans citer de chiffres ; dans le même travail, citant les travaux de KUNKEE et GOSWELL (1977), il signale qu'il est nécessaire d'avoir par litre entre 0,54 et 0,90 mg de SO_2 moléculaire « pour supprimer les organismes de détérioration aérobies dans les moûts de raisin avant la vinification » et il donne un tableau indiquant les quantités d'anhydride sulfureux total à ajouter au moût de raisin pour détruire les organismes aérobies d'altération (Tableau I). Ce tableau est très instructif et devrait inspirer les techniciens car il montre combien l'influence du pH du moût est important et justifie certaines pratiques de sulfitage.

Nous avons essayé de mieux préciser cette valeur antilevure du SO_2 moléculaire à l'aide de quelques essais effectués soit au laboratoire soit dans les chais.

Calcul de la teneur en SO_2 moléculaire.

Pour calculer la teneur en anhydride sulfureux moléculaire, il faut bien entendu tenir compte du pH du vin et de la teneur en anhydride sulfureux libre.

TABLEAU I

**Quantité de SO₂ total à ajouter au moût pour détruire
les microorganismes aérobies d'altération (en mg/l)**

| pH | SO ₂ total | pH | SO ₂ total |
|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
| 2,8 | 55 | 3,4 | 100 |
| 2,9 | 60 | 3,5 | 120 |
| 3,0 | 65 | 3,6 | 140 |
| 3,1 | 70 | 3,7 | 160 |
| 3,2 | 80 | 3,8 | 180 |
| 3,3 | 90 | 3,9 | 200 |

D'après MACRIS et MARKAKIS (1974), on peut calculer le pourcentage de SO₂ moléculaire à partir de la formule :

$$\log \frac{(\text{HSO}_3^-)}{(\text{SO}_2)} = \text{pH} - 1,81$$

ou 1,81 est le pK₁ de l'acide sulfureux.

Cette valeur ne tient pas compte du travail fourni par USSEGLIO-TOMASSET et BOSIA (1984) sur l'étude de la première constante de dissociation de l'acide sulfureux ; 1,81 correspond approximativement à la valeur obtenue pour 10 p. 100 d'alcool à la température de 16° C.

Afin de faciliter les calculs, nous avons établi la formule suivante donnant ce pourcentage en SO₂ moléculaire :

$$\% \text{ SO}_2 \text{ moléculaire} = \frac{100}{10^{\text{pH}-1,81} + 1}$$

Dans le tableau II nous avons fait figurer les pourcentages en SO₂ moléculaire pour la zone de pH généralement rencontrée dans les vins (de 3,0 à 4,0). Pour obtenir la teneur en SO₂ moléculaire d'un vin, il suffit de multiplier ce pourcentage par la teneur en SO₂ libre.

ESSAIS DE LABORATOIRE

A partir d'un vin blanc sec obtenu par fermentation complète à 20° C après ensemencement par des levures sèches *S. bayanus* et centrifugation 25 mn à 3 500 tours par minute, nous avons effectué les opérations suivantes :

TABLEAU II
Pourcentage en SO₂ moléculaire en fonction du pH

| pH | % SO ₂ moléculaire | pH | % SO ₂ moléculaire |
|------|-------------------------------|------|-------------------------------|
| 3,00 | 6,06 | 3,50 | 2,00 |
| 3,02 | 5,81 | 3,52 | 1,91 |
| 3,04 | 5,56 | 3,54 | 1,83 |
| 3,06 | 5,32 | 3,56 | 1,75 |
| 3,08 | 5,10 | 3,58 | 1,67 |
| 3,10 | 4,88 | 3,60 | 1,60 |
| 3,12 | 4,67 | 3,62 | 1,53 |
| 3,14 | 4,47 | 3,64 | 1,46 |
| 3,16 | 4,28 | 3,66 | 1,39 |
| 3,18 | 4,09 | 3,68 | 1,33 |
| 3,20 | 3,91 | 3,70 | 1,27 |
| 3,22 | 3,74 | 3,72 | 1,22 |
| 3,24 | 3,58 | 3,74 | 1,16 |
| 3,26 | 3,43 | 3,76 | 1,11 |
| 3,28 | 3,28 | 3,78 | 1,06 |
| 3,30 | 3,13 | 3,80 | 1,01 |
| 3,32 | 3,00 | 3,82 | 0,97 |
| 3,34 | 2,87 | 3,84 | 0,92 |
| 3,36 | 2,74 | 3,86 | 0,88 |
| 3,38 | 2,62 | 3,88 | 0,84 |
| 3,40 | 2,51 | 3,90 | 0,81 |
| 3,42 | 2,40 | 3,92 | 0,77 |
| 3,44 | 2,29 | 3,94 | 0,74 |
| 3,46 | 2,19 | 3,96 | 0,70 |
| 3,48 | 2,09 | 3,98 | 0,67 |
| | | 4,00 | 0,64 |

— ajustage de la quantité d'alcool à 11 p. 100 et 12,5 p. 100 en volume

— le pH du vin étant de 3,6, nous avons également ajusté le pH d'une partie à 3,3 avec de l'acide tartrique 10 N.

— addition d'un mélange équimoléculaire de glucose et de fructose pour amener la teneur en sucres réducteurs à 36 g par litre.

— ensemencement par un levain *S. bayanus* en phase de déclin, stade où la levure est la plus résistante à l'anhydride sulfureux.

— sulfitage à l'aide d'une solution sulfureuse pour obtenir des teneurs en SO₂ libre de 30 et 50 mg par litre ; les quantités de SO₂ total nécessaires pour obtenir ces teneurs en SO₂ libre ont été calculées à partir de la courbe de combinaison établie expérimentalement pour ce vin sec ; c'est ainsi que les quantités de SO₂ total ajoutées ont été respectivement par litre de 80 mg (pour 30 mg de SO₂ libre par litre) et 120 mg (pour 50 mg de SO₂ libre par litre).

— les échantillons ont été placés d'une part à 10° C, température ambiante de la majorité des chais pendant l'hiver et, d'autre part à 19° C température ambiante de certains chais mal isolés pendant l'été.

Les dénombrements de cellules viables ont été effectués selon la technique de LAFON-LAFOURCADE et JOYEUX (1979) 8 et 16 jours après l'addition de l'anhydride sulfureux. Les résultats obtenus figurent dans le tableau III.

TABLEAU III

**Nombre de cellules viables dans les échantillons
ensemencés avec *S. Bayanus* (après 16 jours)**

le nombre de cellules viables est exprimé par millilitre

| | | pH 3,6 | | pH 3,3 | |
|------------------------------------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|------|
| | | 30 | 50 | 30 | 50 |
| SO ₂ libre (mg/l) | | 30 | 50 | 30 | 50 |
| SO ₂ moléculaire (mg/l) | | 0,50 | 0,80 | 0,95 | 1,55 |
| Alcool (11 % vol.) | T: 10° C | 8. 10 ² | 2. 10 ² | < 1 | < 1 |
| | T: 19° C | 1,6. 10 ⁷ | 1. 10 ⁵ | 10 ⁵ | < 1 |
| Alcool (12,5 % vol.) | T: 10° C | 1,3. 10 ² | < 1 | 2. 10 ¹ | < 1 |
| | T: 19° C | 1,3. 10 ⁶ | 1,4. 10 ² | 4,6. 10 ³ | < 1 |

On peut remarquer l'influence très importante du pH et à un degré moindre de la température sur l'action fongicide de l'anhydride sulfureux ; par contre, l'action de l'alcool paraît plus faible. On constate en effet que, pour des valeurs de SO₂ moléculaire de 1,55 mg par litre, il n'y a eu aucun développement de levures. Les résultats étant plus irréguliers pour des teneurs de 0,80 et 0,95 mg par litre où la température a une action importante, les levures viables étant toujours présentes pour des valeurs de 0,50 mg par litre, en plus grand nombre à température plus élevée.

ESSAIS DANS LES CHAIS

Au cours des vinifications 1983, un essai un peu semblable a été effectué à partir d'un moût issu de raisins botrytisés d'environ 16 % vol. d'alcool en puissance naturel amené à 17,5 % par chaptalisation. Six prélèvements sont effectués à partir de la cuve à différents stades de fermentation correspondant à des teneurs en alcool de 11,8-12,8 et 13,6 % vol.

TABLEAU IV
Nombre de cellules de levures viables

| Alcool (% vol.) | Sucres réducteurs (g/l) | pH | Doses de SO ₂ au mutage (mg/l) | SO ₂ libre (mg/l) | SO ₂ moléculaire (mg/l) | Nombre de cellules viables (par ml) |
|-----------------|-------------------------|------|---|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 11,8 | 93,4 | 3,45 | 240 | 40 | 0,90 | 0 |
| | | | 300 | 67 | 1,50 | 0 |
| | | 3,60 | 240 | 35 | 0,56 | 40 |
| | | | 300 | 61 | 0,97 | 0 |
| | | 3,80 | 240 | 35 | 0,35 | > 200 |
| | | | 300 | 58 | 0,59 | > 200 |
| 12,8 | 76,9 | 3,45 | 240 | 48 | 1,07 | 0 |
| | | | 300 | 77 | 1,72 | 0 |
| | | 3,60 | 240 | 40 | 0,64 | 2 |
| | | | 300 | 72 | 1,15 | 0 |
| | | 3,80 | 240 | 38 | 0,38 | 8 |
| | | | 300 | 70 | 0,71 | 3 |
| 13,6 | 59,2 | 3,45 | 240 | 54 | 1,21 | 0 |
| | | | 300 | 83 | 1,86 | 0 |
| | | 3,60 | 240 | 51 | 0,81 | 6 |
| | | | 300 | 79 | 1,26 | 2 |
| | | 3,80 | 240 | 48 | 0,48 | 10 |
| | | | 300 | 77 | 0,78 | 3 |

Parmi ces échantillons, deux sont laissés au pH normal du moût en fermentation, deux sont additionnés d'acide sulfurique à 10 p. 100 en volume et deux de soude 4 N ; à chaque pH des additions de 240 et 300 mg par litre d'anhydride sulfureux sont effectuées pour assurer l'arrêt de la fermentation. Quinze jours après le mutage on effectue le dosage de l'anhydride sulfureux, du pH ainsi que la numération des cellules viables. Les résultats rapportés dans le tableau IV, appellent les observations suivantes :

— les teneurs en anhydride sulfureux libre sont d'autant plus élevées que la fermentation est plus avancée (en relation vraisemblablement avec

les teneurs en acide pyruvique qui décroissent en fin de fermentation) et que le pH est plus bas ;

TABLEAU V

Teneurs en SO₂ moléculaire et levures viables

| Châteaux | Identification du vin | SO ₂ (mg/l) | | | pH | Nombre de levures viables (par ml) |
|----------|-------------------------|------------------------|-------|-------------|------|------------------------------------|
| | | libre | total | moléculaire | | |
| A | Cuve | 76 | 316 | 1,42 | 3,53 | 1 |
| A | Barriques non soutirées | 64 | 300 | 1,25 | 3,51 | 25 |
| A | Barriques soutirées | 72 | 300 | 1,31 | 3,54 | 480 |
| B | Cuve 1 | 80 | 300 | 1,20 | 3,62 | 1 |
| B | Cuve 2 | 80 | 300 | 1,28 | 3,60 | 21 |
| B | Cuve 3 | 76 | 308 | 1,14 | 3,62 | 9 |
| B | Cuve 4 | 72 | 288 | 1,08 | 3,62 | 2 |
| B | Cuve 5 | 60 | 304 | 0,96 | 3,60 | 1 |
| C | Cuve 1 | 32 | 280 | 0,47 | 3,63 | 76 |
| C | Cuve 2 | 32 | 284 | 0,48 | 3,64 | 64 |
| C | Cuve 3 | 36 | 300 | 0,49 | 3,67 | 52 |
| C | Cuve 4 | 36 | 296 | 0,49 | 3,67 | 24 |
| C | Cuve 5 | 56 | 328 | 0,83 | 3,63 | 30 |
| C | Barriques | 40 | 320 | 0,67 | 3,58 | 1500 |
| D | Cuve 1 | 68 | 320 | 0,75 | 3,74 | 5 |
| D | Cuve 2 | 66 | 272 | 1,06 | 3,58 | 1 |
| D | Cuve 3 | 76 | 370 | 0,99 | 3,66 | 1 |
| E | Barriques | 60 | 296 | 1,08 | 3,55 | 1 |
| E | Barriques | 60 | 300 | 1,02 | 3,57 | 1 |
| F | Cuve | 24 | 300 | 0,29 | 3,70 | 26 |
| F | Cuve | 32 | 300 | 0,35 | 3,75 | 94 |

— pour des valeurs en SO₂ moléculaire inférieures à 0,90 mg par litre on a toujours eu quelques cellules viables, leur nombre n'étant pas en relation avec ces valeurs ni avec la teneur en alcool ;

— pour des teneurs en SO₂ moléculaire égales ou supérieures à 0,90 mg par litre, dans huit cas sur neuf, il n'y a plus de cellules viables : les trois échantillons contenant au moins 1,5 mg par litre de SO₂ moléculaire étant bien entendu dans ce cas.

De plus, nous avons rassemblé dans le tableau V les teneurs en anhydride sulfureux libre, total et moléculaire de vins blancs moelleux ou doux, dont certains présentaient une stabilité incertaine vis-à-vis d'une refermentation, le test utilisé étant tout simplement un séjour d'une semaine à l'étuve à 25° C dans une bouteille bouchée avec un barboteur. On peut s'apercevoir que les échantillons ayant une teneur en SO₂ moléculaire inférieure à 0,80 mg par litre ne sont pas stables et présentent des risques de refermentation, alors qu'au-dessus de 1,20 mg par litre, il n'y a aucun problème, les chiffres compris entre ces deux valeurs ne donnant généralement pas toute garantie vis-à-vis de la stabilité du vin. Lors de l'examen organoleptique de ces vins il semble que la perception de l'odeur caractéristique de l'anhydride sulfureux soit perçue à partir d'environ 2 mg par litre de SO₂ moléculaire.

A l'issue de ces résultats nous avons repris sur les vins de 1983 une petite étude des vins de la région de Sauternes-Barsac en chai logés soit en cuve soit pour quelques-uns en barriques. Dans le tableau V nous avons fait figurer quelques résultats.

Dans le cas des vins logés en cuve, si les résultats sont parfois un peu irréguliers, on constate généralement que pour des valeurs d'anhydride sulfureux moléculaire supérieures à 1,20, le nombre de levures viables est généralement inférieur ou égal à 2 par millilitre (sauf dans un cas où il est de 21), pour les teneurs en SO₂ moléculaire inférieures à 0,80 mg par litre, le nombre de levures est toujours supérieur à 20 par millilitre.

Par contre, pour les vins en barriques les résultats sont très variables et certainement fonction de la propreté des chais et des soins apportés au nettoyage des barriques ; pour le château A, la différence constatée entre le nombre des levures pour les barriques soutirées et non soutirées pour une valeur de SO₂ moléculaire sensiblement identique, est assez troublante ; le soutirage effectué sans prendre suffisamment de précaution dans la propreté du matériel est un élément de contamination en levures non négligeable.

A l'issue de ces observations, il ressort que, si l'anhydride sulfureux moléculaire a une action certaine sur le développement des levures, le soin apporté aux différentes manipulations du vin et à la propreté du

matériel de transfert (pompes et tuyauteries) et de stockage (cuve et surtout barrique) a également une influence très importante. Une teneur faible en SO_2 moléculaire associé avec une hygiène rigoureuse du chai donne presque autant de sécurité qu'une teneur élevée jointe à des conditions d'hygiène insuffisantes.

Enfin, nous avons eu l'occasion d'examiner un dépôt de vin blanc demi-sec en bouteilles, qui était constitué uniquement d'un grand nombre de levures dont certaines paraissaient visiblement en cours de multiplication sans que le vin présente les caractères d'une fermentation ; la détermination de l'anhydride sulfureux libre et du pH nous a permis de constater que ce vin possédait une teneur en SO_2 moléculaire de 1,49 mg par litre, ce qui n'avait pas cependant suffi à éviter un développement levurien.

CONCLUSION

De tous ces résultats et toutes ces observations globalement assez concordantes, on peut tirer les conclusions suivantes :

— pour assurer un bon arrêt de fermentation par mutage à l'anhydride sulfureux, il est nécessaire d'obtenir dans le vin une teneur en SO_2 moléculaire de 1,50 mg par litre : ceci doit permettre, en fonction du pouvoir de combinaison du vin et de son pH, de mieux fixer les quantités d'anhydride sulfureux à ajouter lors de cette opération.

— pour assurer une bonne conservation des vins contenant des sucres résiduels (demi-secs, moelleux et doux), après élimination des levures par soutirage, collage ou filtrage (ou plusieurs de ces traitements), il semble que la valeur de 1,20 mg par litre de SO_2 moléculaire soit suffisante, des valeurs plus basses ne devant être utilisées que dans des cas bien déterminés de vins pauvres en levures et conservés à basse température ; bien entendu ces valeurs concernent des vins non additionnés d'acide sorbique.

— enfin, l'odeur caractéristique de l'anhydride sulfureux n'apparaît que pour des valeurs égales ou supérieures à 2 mg par litre de SO_2 moléculaire.

Manuscrit reçu le 14 janvier 1985 ; accepté pour publication le 27 février 1985.

RÉSUMÉ

Après avoir calculé les pourcentages d'anhydride sulfureux moléculaire des vins en fonction du pH, nous avons étudié, au laboratoire et dans les chais, l'influence de la température et de la teneur en alcool sur l'action antilevure de ce SO_2 moléculaire. Des valeurs de 1,50 mg par litre au mûtage et de 1,20 mg par litre pendant la conservation, sont nécessaires pour éviter une refermentation des vins blancs contenant des sucres résiduels.

SUMMARY

After having calculated molecular sulfur dioxide percentage in wines relative to pH, we studied, in the laboratory and in cellary the influence of temperature and alcoholic content on the antiyeast activity of the molecular SO₂.

Values of 1,5 mg per liter at the fermentation stopping and of 1,2 mg per liter during aging are necessary to avoid refermentation of white wines containing residual sugary.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach dem Berechnen des Prozentualgehaltes von molekularem Schwefelhydrid im Wein je nach pH haben wir im Labor und im Keller den Einfluss der Temperatur und des Alkoholgehaltes auf die Anti-Hefe-Wirkung dieses molekularen SO₂ untersucht. Werte von 1,50 mg/l beim Stoppen der Gärung und 1,2 mg/l während der Lagerung sind notwendig, um ein erneutes Gären von Weissweinen mit einem Restzuckergehalt zu unterbinden.

RESUMEN

La forma molecular SO₂ del anhídrido sulfuro tiene virtudes de antifermento.

Se estudia aquí este efecto protector, relacionándolo con la acidez, la temperatura y el grado alcohólico de los vinos.

Si se quiere mayor seguridad con los vinos que conservan azúcar, se aconsejan las dosis siguientes de SO₂ molecular : 1,50 mg/l cuando se apagan los mostos y 120 mg/l al embotellado.

RIASSUNTO

Dopo aver calcolato i percentuali di anidride solforosa molecolare dei vini in funzione del pH, abbiamo studiato al laboratorio e nelle cantine, l'influenza della temperatura e del tenore in alcole sull'azione antilievito di quest'anidride solforosa molecolare. Valori di 1,50 mg per litro alla mutizzazione e di 1,20 mg per litro durante la conservazione sono necessarie per evitare una nuova fermentazione dei vini bianchi che contengono zuccheri residuali.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEECH F.W., BURROUGHES L.F., TIMBERLAKE C.F. et WHITING G.C., 1979. Progrès récents sur l'aspect chimique et l'action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux, *Bull O.I.V.*, **586**, 1001-1022.
- KUNKEE R.E. et GOSWELL R.W., 1977. *Economic Microbiology*, **1**, 315-386, éd. ROSE (A.H.), London, Academic Press.
- LAFON-LAFOURCADE S. et JOYEUX A., 1979. Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les moûts et les vins, *Connaissance Vigne Vin*, **13**, N° 4, 295-310.

- MACRIS B.J. et MARKAKIS P., 1974. Transport and toxicity of Sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *J. Sci. Fd. Agric.*, **25**, 21-29.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1979. *Sciences et Techniques du Vin*, Tome 4, Dunod ed., Paris.
- USSEGLIO-TOMASSET L. et BOSIA P.D., 1984. Détermination de la première constante de dissociation de l'anhydride sulfureux. *Feuillets Verts O.I.V.*, N° 784.