

INHIBITIONS NON CONVENTIONNELLES DES CROISSANCES LEVURIENNES : EFFETS INTERSPECIFIQUES ET ESSAIS DE LEVEE D'INHIBITION

P. STREHAIANO, M. MOTA* et G. GOMA

Département de Génie Biochimique et Alimentaire, ERA-CNRS N° 879
INSA, Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex (France)

* Université de Porto
Rua dos Bragas 4099 Porto Cedex (Portugal)

INTRODUCTION

L'étude des mécanismes d'inhibition en fermentation alcoolique (levurienne), tant sur des milieux synthétiques que naturels (œnologie), a incité ces dernières années, plusieurs auteurs à discuter le rôle réel de l'alcool et à suggérer l'intervention de co-métabolites inhibiteurs efficaces à très faibles concentrations.

En effet, comme l'ont montré NOVAK et *al.* (1981), l'inhibition de la croissance due à l'alcool ajouté dans le milieu est beaucoup plus faible que celle liée à l'alcool produit (par les levures). Cette observation a conduit à envisager l'accumulation d'alcool à l'intérieur des cellules, (NAGODAWITHANA et STEINKRAUS 1976 ; NAVARRO et DURAND, 1978 ; NOVAK et *al.*, 1981 ; STREHAIANO et GOMA, 1983).

Ainsi, le taux d'alcool mesuré dans le milieu ne serait pas une image exacte de celui auquel est soumise réellement la cellule. Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer entièrement les phénomènes d'inhibition observés, et tout spécialement les effets du taux d'ensemencement sur les cinétiques fermentaires (STREHAIANO et *al.*, 1983).

Aussi, plusieurs équipes, travaillant sur des aspects très différents de la fermentation alcoolique — optimisation des conditions de fermentation en vue de la production d'alcool industriel, étude des arrêts de fermentation en vinification — ont suggéré, récemment, l'intervention de co-métabolites inhibiteurs, sur la nature desquels cependant le débat reste encore ouvert. BORZANI et *al.*, (1981), lors de l'étude de la fermentation alcoolique de mélasses attribuent les inhibitions observées aux alcools supérieurs — et en particulier à l'alcool amylique. MAIORELLA et *al.* (1983) démontrent l'effet inhibiteur exercé sur la croissance et la production d'alcool par divers produits secondaires de la fermentation -

acide acétique, acétaldéhyde, glycérol... En 1983, en étudiant le problème des arrêts de fermentation en vinification, l'équipe de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux met en évidence le rôle inhibiteur marqué des acides gras supérieurs de la série acétique (C_6 , C_8 , C_{10} , C_{12}) et de leurs esters (GENEIX et al., 1983a, 1983b), effet déjà signalé, sur la levure de bière par NORSTROM (1964). Ces mêmes auteurs proposent d'ailleurs le traitement de ces arrêts de fermentation par les « écorces » de levure (GENEIX et al., 1983b ; LAFON-LAFOURCADE et al., 1984). Pour notre part, nous avons pu montrer que ces co-métabolites exercent sur les variables cinétiques de la fermentation, un effet plus inhibiteur que l'éthanol (STREHAIANO et al., 1984).

Dans ce travail, nous nous attacherons d'abord à quantifier l'effet inhibiteur observé sur la croissance levurienne et ce, en étudiant l'inhibition exercée par une souche sur son propre développement ainsi que celle qu'une souche peut exercer sur le développement de souches différentes (auto-inhibition et inhibition croisée).

Dans une deuxième partie, nous présenterons les résultats obtenus lors d'essais de « levée » d'inhibition par divers adjuvants, dont les « écorces » de levure.

MATERIEL ET METHODES

I — MATERIEL BIOLOGIQUE

Les souches levuriennes dont nous avons testé le pouvoir inhibiteur, et la résistance à l'inhibition, sont :

- *Saccharomyces uvarum* (collection laboratoire)
- *Saccharomyces cerevisiae*, clone UG 5 (collection laboratoire)
- *Saccharomyces cerevisiae sake* (clone de l'I.A.M. Tokyo)
- *Saccharomyces bayanus* (sélection INRA Narbonne).

Les levains sont issus d'une culture de 18 h, à 30° C, en semi-anaérobiose (fioles d'erlenmeyer bouchées au coton), sur un milieu à 20 g de glucose par litre. L'apport de levain est calculé de façon à obtenir une concentration en levures de l'ordre de 10^7 cellules par millilitre.

II — MILIEU

Le milieu de culture est celui de NAGATANI et al. (1968), dont la concentration en extrait de levure a été réduite à 1 g par litre. Sa composition par litre est la suivante :

KH_2PO_4 : 5 g ; $(NH_4)_2 SO_4$: 2 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,4 g ; extrait de levure : 1 g.

La teneur en glucose est de 20 ou 50 g par litre (cf. ci-dessous). Le pH est ajusté à 3,75 après stérilisation.

III — ADJUVANTS

Les adjuvants testés pour lever les inhibitions sont : le charbon actif, la bentonite, les billes de verre expansé, le silica-gel, la silice aminée et les écorces de levures, tous à la dose uniforme de 50 g par hectolitre.

Ces adjuvants sont utilisés suivant le schéma expérimental défini ci-dessous.

IV — TECHNIQUES ANALYTIQUES. CONDITIONS DE CULTURE

Les fermentations sont réalisées en fioles d'erlenmeyer ou en tubes à essais, à température contrôlée (30° C) et sous agitation permanente (table agitante).

La croissance levurienne est appréciée par la mesure de la densité optique à 620 nm dont nous avons montré (MOTA, 1982) qu'elle se liait parfaitement à la concentration cellulaire exprimée en g de poids sec par litre (relation non linéaire).

La teneur en glucose est mesurée par réaction enzymatique, à l'appareil Y.S.I. 27A.

V — SCHEMAS EXPERIMENTAUX

a) Le schéma expérimental retenu pour étudier les phénomènes d'inhibition est le suivant :

- Fermentation d'un milieu à 50 g de glucose par litre par une des souches,
- Lorsque la teneur en sucre n'est plus que de 20 g par litre, ce qui correspond au début de la phase de ralentissement de la croissance (manifestation de mécanismes de limitation ou d'inhibition), le milieu est séparé des cellules par filtration sur une membrane à 0,45 μ m de porosité,
- Ce milieu partiellement fermenté (dont la teneur en sucre est de 20 g par litre) va être utilisé, après réajustement aux conditions initiales du pH et des teneurs en éléments nutritifs, comme milieu de croissance et inoculé avec des levains frais de cette même souche (auto-inhibition) et des autres souches testées (inhibition croisée),
- Les croissances obtenues sur ces milieux sont comparées à celles obtenues pour les mêmes souches, sur un milieu frais à 20 g de glucose par litre, et à taux d'alcool identique,
- Il a bien sûr été vérifié que le taux d'alcool (\approx 1,5° G.L.) n'était pas en soi inhibiteur.

b) La deuxième partie de ce travail concerne l'étude de l'efficacité de divers adjuvants susceptibles d'éliminer les effets inhibiteurs observés, en « auto-inhibition » sur *Saccharomyces bayanus*. Ces adjuvants, définis plus haut, sont utilisés de la façon suivante :

Le milieu pré-fermenté par *Saccharomyces bayanus* (cf. ci-dessus) est, après filtration stérilisante, mis en contact pendant deux heures avec ces additifs (à 50 g par hectolitre), sous agitation.

Après ce contact, l'adjuvant est éliminé par filtration à 0,2 μm et le milieu est, après réajustement aux conditions initiales du pH et de la teneur en éléments nutritifs, inoculé avec un levain frais de la souche étudiée.

RESULTATS

I — ETUDE ET QUANTIFICATION DES « INHIBITIONS »

La figure 1 illustre l'effet inhibiteur exercé par *Saccharomyces bayanus* sur son propre développement (auto-inhibition), par rapport à une croissance témoin.

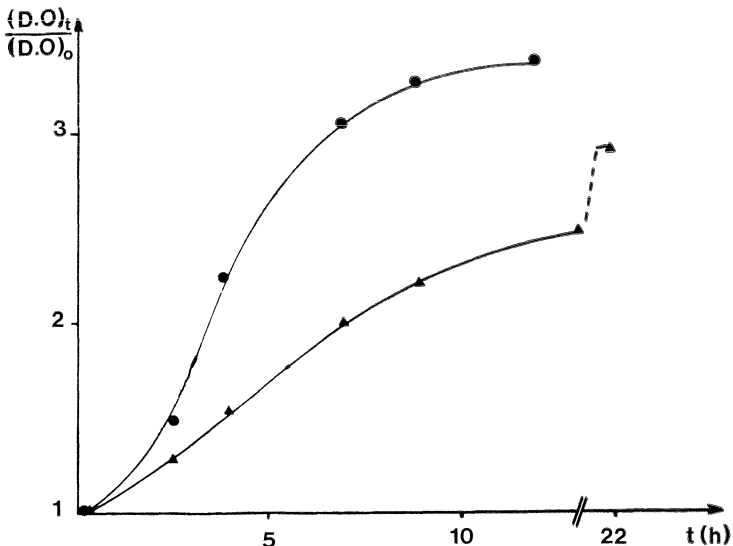


Fig. 1. — Croissance de *Saccharomyces bayanus* (exprimée en unités densité optique)
 — sur un milieu frais, à 20 g par litre de substrat : ●
 — sur un milieu partiellement préfermenté par cette même souche : ▲

Il est facile de remarquer que :

- les temps de fermentation (consommation totale du substrat) sont nettement différents et correspondent à des vitesses moyennes de consommation du substrat de 1,85 g/litre/heure pour le témoin et de 0,95 g/litre/heure en condition d'inhibition,

TABLEAU I

Comparaison des activités cataboliques moyennes R_s (g/litre/heure) de souches levuriennes croissant sur des milieux frais (témoin) et sur des milieux partiellement fermentés par ces mêmes souches.

MILIEU DE CROISSANCE		SOUCHE INOCULEE			
		<i>S. cerevisiae</i> UG 5	<i>S. bayanus</i>	<i>S. cerevisiae</i> sake	<i>S. uvarum</i>
Milieu frais témoin		1,55	1,82	1,54	0,95
Milieu Préfer- menté par	<i>S. cerevisiae</i> UG 5	0,80	1	0,80	0,42
	<i>S. bayanus</i>	0,80	1	0,83	0,42
	<i>S. cerevisiae</i> sake	0,73	1	0,80	0,42
	<i>S. uvarum</i>	0,49	1	0,50	0,53

- les niveaux de biomasse formée sont également différents, ce qui traduit une diminution sensible du rendement de la conversion sucre-cellule.

Par ailleurs, une analyse détaillée des variables de vitesse spécifique (taux de croissance en particulier) a mis en évidence une réduction de leurs valeurs maximales lors des croissances sur milieu pré-fermenté (STREHAIANO, 1984).

Pour comparer les effets « croisés », nous avons retenu la variable « vitesse moyenne de consommation du substrat », c'est-à-dire le quotient du substrat consommé (g par litre) par le temps nécessaire à son épuisement (h) soit $r_s = \frac{\Delta S}{t_F}$ (g/litre/heure).

Les résultats des croissances obtenues sur les milieux pré-fermentés — pour différentes souches — comparées aux témoins, sont portés sur le tableau I, à double entrée :

- les lignes correspondent à la nature du milieu pré-fermenté ; la première illustrant les croissances « témoin » sur milieu frais,
- les colonnes correspondent à la nature de la souche inoculée,
- la diagonale soulignée donne les valeurs de l' « auto-inhibition ».

Ce tableau met en évidence plusieurs points intéressants :

- On notera d'abord les vitesses fermentaires très différentes des souches testées : la plus efficace étant *Saccharomyces bayanus* (1,82 g/litre/heure), la plus lente *Saccharomyces uvarum* (0,95 g/litre/heure).

- Toutes les souches exercent un effet inhibiteur, sur leur propre développement, et sur le développement d'autres souches, l'effet en « auto-inhibition » se manifestant dans la majorité des cas, plus faiblement qu'en « inhibition croisée ». Cette observation, qui doit être vérifiée sur un plus grand nombre de souches, d'espèces et de genres, peut expliquer les phénomènes observés en écologie levurienne, lors de fermentations alcooliques spontanées.

- La souche qui exerce le pouvoir inhibiteur le plus marqué est *Saccharomyces uvarum*, tandis que celle qui résiste le mieux aux « inhibitions » est *Saccharomyces bayanus*. L'on peut d'ailleurs remarquer que *Saccharomyces bayanus* présente la même vitesse catabolique (1 g/litre/heure) quel que soit le milieu pré-fermenté sur lequel elle se développe.

A ce sujet, il faut noter que cette souche de *Saccharomyces bayanus* a été isolée et est commercialisée comme levure « finisseuse ». Ce

caractère « finisseur » est donc plus qu'une simple résistance aux taux élevés d'alcool, critère vis-à-vis duquel *Saccharomyces cerevisiae sake* lui est d'ailleurs supérieure (MOTA et al., 1984).

Il faut aussi préciser que, malgré son pouvoir inhibiteur élevé, *Saccharomyces uvarum* est défavorisée — en terme de compétition de croissance — par sa faible vitesse fermentaire.

II — ETUDE DES LEVEES D'INHIBITION PAR DIVERS ADJUVANTS

Les essais de levée d'inhibition, menés suivant le protocole expérimental précisé ci-dessus ont conduit aux résultats consignés dans le tableau II ; la variable de comparaison utilisée est comme dans l'étude des inhibitions, la vitesse moyenne de consommation du substrat (g/litre/heure).

TABLEAU II

Action de divers adjuvants sur la levée d'auto-inhibition chez *Saccharomyces bayanus* exprimée par l'activité catabolique moyenne R_s (g/litre/heure).

	Activité catabolique moyenne R_s (g/litre/heure)	
Témoin	1,80	
Milieu préfermenté	0,95	
	Ecorces de levure	1,10
	Charbon actif	1,11
Nature	Bentonite	1,11
de	Billes de verre expansé	1,14
l'adjuvant	Silica Gel 1	1,11
(50 g/l)	Silica Gel 2	1,10
	Silice aminée	1,14

Ces résultats tendent à prouver que l'incidence des molécules inhibitrices présentes dans les milieux pré-fermentés peut être atténuée, bien que, lors de nos essais, nous n'obtenions jamais une élimination complète de l'inhibition (par rapport au témoin sur milieu frais).

Cependant, quelle que soit la nature de l'adsorbant utilisé — minéral ou organique — les résultats sont identiques ; ceci laisse supposer qu'il s'agit donc d'un mécanisme d'adsorption simple. Dans un travail plus exhaustif en cours, nous relierons ces effets des additifs à leurs aires spécifiques, afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Il faut bien préciser qu'il ne s'agit là que d'essais réalisés sans aucune contrainte d'ordre technologique sur des milieux synthétiques, bien différents d'un moût de raisin. Or, en vinification par exemple, il est nécessaire de prendre en compte les éventuels effets secondaires sur la couleur, la teneur en arômes, etc. Ainsi par exemple, le charbon actif, adjuvant efficace, ne peut être utilisé, en vinification, à cause de ces effets secondaires, ainsi que l'ont d'ailleurs précisé LAFON-LAFOURCADE et *al.*, (1938b).

Nos travaux confirment l'efficacité des écorces de levures, dont le mécanisme d'action a été étudié par LARUE et *al.*, (1984), mais ne mettent pas en évidence une activité spécifique supérieure à celle des autres adjuvants.

Au contraire, et cela reste à préciser de façon plus fine, l'utilisation des billes de verre expansé, totalement neutres et non génératrices de mauvais goûts ou odeurs apparaît plus efficace en raison d'une efficacité un peu supérieure à celle des écorces, et surtout, d'une très grande facilité de récupération dans le milieu.

CONCLUSION

Ces résultats confirment nos travaux antérieurs sur les mécanismes d'auto-inhibition des levures en fermentation alcoolique (STREHAIANO, 1984 ; STREHAIANO et *al.*, 1983, 1984), et par l'analyse quantitative conduite permettent d'apprécier les pouvoirs antagonistes des souches, mais aussi leurs capacités de résistance à l'inhibition.

Bien qu'obtenues dans des conditions expérimentales sensiblement différentes de celles de la vinification, ces données peuvent être des éléments d'approche intéressants dans l'étude de la dynamique des populations levuriennes « naturelles ». Elles peuvent en effet permettre, associées aux mécanismes classiques et connus de l'action de l'alcool et des différences dans les vitesses de croissance, d'expliquer les successions de souches, d'espèces et de genres dans un milieu en fermentation.

Mais ces mécanismes d'inhibition, renforçant en quelque sorte les effets « killer » (BARRE, 1981) doivent aussi être un frein supplémentaire à l'implantation d'une souche dans un milieu non stérile.

En ce qui concerne les adjuvants susceptibles d'éliminer — au moins partiellement — les inhibitions observées — et sans préjuger en rien

de la nature des inhibiteurs — nous pouvons supposer qu'il n'y a pas d'adsorbant spécifique, mais qu'il existe un grand nombre de substances actives.

Le choix de l'une ou de l'autre se fera en définitive selon le « but » de la fermentation mise en œuvre, c'est-à-dire de l'importance que l'on attachera aux effets secondaires.

Manuscrit reçu le 4 mars 1985 ; acceptée pour publication le 3 mai 1985.

RÉSUMÉ

Les phénomènes d'inhibition observés en fermentation alcoolique levurienne sont imputables à l'alcool mais aussi à des co-métabolites produits par la levure.

Les aptitudes de quatre souches à inhiber leur propre développement ainsi que celui des autres souches sont discutées.

Nous montrons qu'il est également possible d'éliminer ces inhibiteurs par adsorption sur divers adjuvants, sans toutefois parvenir à une réactivation complète.

SUMMARY

Along with ethanol, secondary products of yeast metabolism inhibit the alcoholic fermentation.

The abilities of four strains to inhibit their own development likewise that of others strains are discussed.

we demonstrate the possibility to eliminate these inhibitors by adsorption on different materials, however without succeeding in an entire reactivation.

ZUSAMMENFASSUNG

Die bei der alkoholischen Hefegärung beobachteten Hemmungserscheinungen sind auf den Alkohol zurückzuführen, aber auch auf von der Hefe erzeugte stoffwechselprodukte.

Es wird die Fähigkeit von vier Stämmen untersucht, ihre eigene Entwicklung und die von anderen Stämmen zu hemmen.

Wir zeigen auf, dass es möglich ist, diese Hemmer durch Adsorbierung auf verschiedenen Zusatzstoffen zu eliminieren, ohne dass es dabei aber zu einer vollständigen Reaktivierung kommt.

RESUMEN

La fermentación alcohólica produce sí misma sus propios inhibidores que son el etanol y otras sustancias identificadas.

Se estudia aquí la resistencia de cuatro tipos de levaduras y la actitud que tienen frente a otras levaduras en los mostos.

Es posible limitar esta inhibición añadiendo varias sustancias a los mostos. Se observa una activación añadiendo varias sustancias a los mostos. No se observa una activación completa de las levaduras, a pesar de todo.

RIASSUNTO

I fenomeni d'inibizione osservati nella fermentazione alcolica con lieviti sono imputabili a l'alcole ma anche a co-metaboliti prodotti dal lievito.

Le capacità di quattro varietà di lieviti ad inibire il proprio sviluppo come quello delle altre varietà sono discusse.

Mostriamo che è anche possibile eliminare quest'inibitori con adsorbimento su diversi adiuvanti, senza tuttavia pervenire ad una reattivazione completa.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARRE P., 1981. Intervention du mécanisme « killer » dans la concurrence entre souches de levures en Cœnologie. *Colloque Soc. Fr. Microbiol.*, Reims, 109-124.
- BORZANI W., VAIRO M.L.R., KOSHIMIZU L.H., DE MELO CRUZ M.R. et PEREGO L., 1981. Kinetics of amyl alcohol production during ethanol fermentation of blackstrap molasses. *Biomass*, 1, 115-126.
- 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. Sci. Paris*, 296D, Série III, 943-947.
- 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.
- 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.
- MAIORELLA B., BLANCH H.W et WILKE C.R., 1983. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 103-121.
- MOTA M., 1982. Fermentation alcoolique : Mécanismes d'inhibition. *Mémoire D.E.A.* - I.N.S.A. Toulouse.
- MOTA M., STREHAIANO P. et GOMA G., 1984. Studies on conjugate effects of substrate and product on cell growth kinetics during fermentation of different yeast strains. *J. Inst. Brew.*, 90, 359-362.
- NAGATANI M., SHODA M. et AIBA S., 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *J. Ferment. Technol.*, 46, 241-248.

- NAGODAWITHANA T.W. et STEINKRAUS K.H., 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation. *Appl. Env. Microbiol.*, 31, 158-162.
- NAVARRO J.M. et DURAND G., 1978. Fermentation alcoolique : influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 129b, 215-221.
- NORSTROM K., 1964. Formation of esters from acids by brewer's yeast. IV. — Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids. *J. Inst. Brew.*, 70, 223-242.
- NOVAK M., STREHAIANO P., MORENO M. et GOMA G., 1981. Alcoholic fermentation : on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 201-211.
- STREHAIANO P. et GOMA G., 1983. Effect of initial substrate concentration on two wine yeasts : relation between glucose sensitivity and ethanol inhibition. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 34, 1-5.
- STREHAIANO P., MOTA M. et GOMA G., 1983. Effect of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 5, 135-140.
- STREHAIANO P., 1984. Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique. *Thèse d'Etat*. Toulouse, INP, N° 80.
- STREHAIANO P., URIBELARREA J.L., MOTA M. et GOMA G., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation : kinetic and physiological observations. *Communication VI th. Inter. Symposium on Yeasts*. Montpellier. 11.1.0.