INFLUENCE DE L'ÉTHANOL SUR LA FORMATION DES VOILES DE LEVURE ISOLÉES DE VINS JAUNES

EFFECT OF ETHANOL ON YEAST FILM FORMATION

H. ALEXANDRE[1], Fanny BERTRAND et Claudine CHARPENTIER

Laboratoire d'Œnologie, Institut Jules Guyot, Université de Bourgogne, 21004 Dijon (France)

Résumé : Chez les levures à voile, la présence d'éthanol dans le milieu de culture favorise la formation du voile de levure. L'éthanol modifie également l'hydrophobicité de surface cellulaire (HSC) de la paroi de levure. Une souche incapable de former un voile possède une HSC significativement plus faible que la souche sauvage, ce qui semble montrer que l'HSC joue un rôle dans la formation du voile. Différents traitements chimiques et enzymatiques de la paroi cellulaire ont montré que les composés responsables de l'HSC sont de nature protéique ou glycoprotéique.

Abstract : In this study, we have investigated the influence of ethanol on yeast film formation and cell surface hydrophobicity (CSH). A yeast strain (P3) previously isolated from film yeast was grown in a medium containing increasing ethanol concentration ranging from 0 to 14 p. cent (v/v). It results from this study that up to 10 p. cent ethanol, the greater was the ethanol concentration, the greater was the growth of film. Using two different techniques (phase partition method, magnobead assay), we have shown that ethanol altered the CSH of the yeast. The measured hydrophobicity (p. cent) of cells grown without ethanol was 65 p. cent compared with 81 p. cent with 14 p. cent (v/v) ethanol. Taking into account the increase in CSH with increasing ethanol concentration which leads to greater film development, it seems likely that CSH alteration constitutes an adaptation mechanism which allows the cell to rise to the surface where growth conditions are favoured i.e oxydative metabolism. The role of CSH on yeast film formation was sustained by using a wine strain (3079) enable to form a film on the liquid surface, thus we have shown that this yeast possess a lower CSH (50 p. cent) compared to P3 strain (80 p. cent). However, CSH is not the only determinant for film formation since a respiratory deficient mutant (P3 *rho*$^-$) with high cell surface hydrophobicity (80 p. cent) could not form a film. Treatment of cells with lyticase which dramatically reduced CSH of P3 strain from 80 to 15 p. cent points out the protein or glycoprotein nature of the component responsible for CSH.

Mots clés : levure à voile, formation de voile, hydrophobicité, vin jaune

Key words : flor yeast, velum formation, hydrophobicity, sherry wine

INTRODUCTION

Dans certains vins à la fin de la fermentation alcoolique, les cellules de levures remontent à la surface où elles croissent et forment un voile qui peut persister plusieurs mois (Sherry wine) et même plusieurs années (Vin « Jaune »). Ces souches de levures appelées souches de voile appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (*beticus*, *cheriensis*, *montuliensis* et *rouxii*) (IBEAS *et al.*, 1997). La formation d'un voile après la FA (fermentation alcoolique) se traduit par des modifications importantes des caractéristiques organoleptiques du vin liées au métabolisme oxydatif des levures de voile. En effet, ces vins contiennent jusqu'à 500 mg/l d'éthanal (MARTINEZ *et al.*, 1997a) et jusqu'à 1 mg/l d'hydroxy-3 diméthyl–4,5 2(5H) furanone, ou sotolon, considéré comme un marqueur de typicité du vin (DUBOIS *et al.* 1976).

La formation du film en contact avec l'air permet aux levures d'avoir un métabolisme oxydatif. Selon MARTINEZ *et al.* (1997b), dans de telles conditions, les levures peuvent résister à de fortes teneurs en alcool. Ce métabolisme oxydatif semble essentiel puisque des levures incapables de respirer (mutant respiratoire) sont incapables de former un voile (JIMENEZ et BENITEZ, 1988). Nous avons peu d'informations concernant les caractéristiques moléculaires et physiologiques de ces levures, et encore moins de connaissance concernant la formation du voile. Cependant, en plus du métabolisme oxydatif, l'hydrophobicité de surface de ces levures semble être déterminante dans la formation du voile (IIMURA *et al.*, 1980). Ces auteurs ont comparé l'hydrophobicité de surface des cellules (HSC) de levures formant et ne formant pas de voiles. Ils ont conclu que le passage d'une levure de l'état non voile à l'état voile se traduisait par une modification de

1 : correspondance (rvalex@u-bourgogne.fr)

J. Int. Sci. Vigne Vin, 1999, **33**, n°1, 25-29

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

l'HSC. Afin de mieux comprendre le rôle de l'HSC dans la formation du film et l'incidence de l'éthanol, nous avons mesuré ce paramètre sur des levures à voile et leur mutant respiratoire cultivés en présence de concentrations croissantes d'éthanol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - SOUCHES DE LEVURE

La souche de voile utilisée (P3) de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* a été isolée à partir d'un voile de vin jaune. *Saccharomyces cerevisiae* 3079 est une souche commerciale (Lallemand). Le mutant respiratoire P3 (*rho*$^-$) a été isolé à partir d'une culture de la souche P3 sur milieu YPD (0,5 p. cent d'extrait de levure, 1 p. cent de peptone, 2 p. cent de glucose) en présence de 15 p. cent d'éthanol (JIMENEZ et BENITEZ, 1988). Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été étalées sur milieu YPDG (0,5 p. cent d'extrait de levure, 1 p. cent de peptone, 0,1 p. cent de glucose, 3 p. cent de glycérol, 2 p. cent d'agar) et, après incubation à 25°C pendant 3 jours, les petites colonies ont été sélectionnées.

II - MILIEUX DE CROISSANCE ET CONDITIONS DE CULTURE

Les levures sont cultivées sur milieu YPDG, contenant différentes concentrations d'éthanol (milieu YPDGE). Pour la formation des voiles, nous avons utilisé le milieu décrit par FORNACHON (1953) de composition suivante : 0,1 p. cent p/v d'extrait de levure, 0,05 p. cent p/v de $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 p. cent KH_2PO_4, 0,1 p. cent $MgSO_4$, 0,1 p. cent $CaCl_2$, 0,5 p. cent glycérol et 0,003 p. cent de citrate de fer. Le voile se développe sur ce milieu en fiole de Roux qui présente l'avantage d'offrir une grande surface de contact avec l'air.

Les milieux de croissance sont ensemencés à une concentration de 10^6 cellules/ml à partir d'un milieu de préculture (YPD). Pour la formation des voiles, 250 ml de milieu de Fornachon sont ensemencés à une concentration de 10^6 cellules/ml. Au bout de 15 jours, lorsque le voile est bien formé, les cellules du voile sont prélevées séparément des cellules ayant sédimenté au fond (cellules du fond) de la fiole de Roux. Le dénombrement cellulaire est réalisé avec une cellule de Thoma.

III - DÉTERMINATION DE L'HYDROPHOBICITÉ DE SURFACE DES CELLULES

1) Méthode de partition de phase (ROSENBERG *et al.*, 1980)

Les cellules cultivées sur milieu YPDG, YPDGE ou Fornachon sont récoltées en phase stationnaire, centrifugées (10 min, 1000 g), rincées avec de l'eau distillée et mises en suspension dans du tampon PUM (pH 7,1, 110 mM de $KH_2PO_4.3H_2O$, 30 mM d'urée, 8 mM $MgSO_4.7H_2O$) à une A_{620} de 1. Deux millilitres d'hexadecane sont ajoutés à la suspension de cellules, les deux phases sont agitées vigoureusement pendant 2 minutes. Après séparation des phases (15 minutes), la densité optique de la phase aqueuse est mesurée à 620 nm. L'hydrophobicité est calculée à partir de la formule :

$$\text{p. cent hydrophobicité} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

A_i = absorbance initiale, A_f = absorbance finale

2) Méthode des microbilles de latex paramagnétique (STRAVER et KIJNE, 1996)

L'adhésion des cellules de levure à des microbilles de latex (0,9 µm, Sigma) paramagnétique (figure 1) a été déterminée de la façon suivante. Les cellules sont récoltées en phase stationnaire, lavées et remises en suspension dans du tampon acétate (50 mM, pH 4,5) à une A_{620} de 0,4 (Absorbance initiale). 15 µl de billes sont ajoutés à 1 ml de suspension cellulaire, le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante sous agitation (100 rpm). Après incubation, un aimant (Samarium-Cobalt) est appliqué contre la paroi du tube et au bout de trois minutes, la A_{620} du surnageant est lue (Absorbance finale). Le pourcentage d'hydrophobicité est déterminé comme précédemment.

IV - TRAITEMENT CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE DES CELLULES

L'influence du dithiotréitol (DTT) et de la lyticase (glucanase, Sigma) sur l'hydrophobicité de surface des parois de levure a été déterminée en mesurant l'hydro-

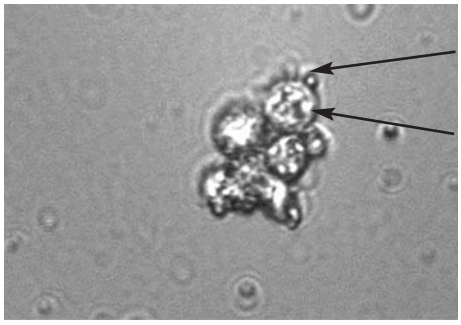


Fig. 1 - Microbilles de latex (0,9 µm) fixées à la surface de la paroi des cellules de la souche P3

Fig. 1 - Latex microbeads (0,9 µm) fixed on the cell surface of the yeast strain P3

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

phobicité de surface des cellules avant et après traitement des cellules.

Les cellules sont récoltées, lavées et remises en suspension dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7,4) contenant 0,6 M KCl. Le dithiotréitol (1 mg/ml) est ajouté à la suspension cellulaire maintenue à 37°C pendant 30 min sous agitation. Les cellules sont ensuite lavées plusieurs fois, puis un aliquote est dilué dans du tampon PUM à une $D.O_{620}$ de 1. L'hydrophobicité est déterminée en utilisant la méthode de partition de phase. Le reste de la suspension cellulaire est dilué dans du tampon phosphate en présence de lyticase (0,1 mg/ml), puis maintenu 30 minutes à 30°C sous agitation douce. La protection des cellules par 0,6 M de KCl contre l'éclatement a été contrôlée au microscope. Les mesures d'hydrophobicité des cellules témoins et des cellules traitées à la lyticase sont réalisées dans du tampon PUM contenant 0,6 M de KCL.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I - EFFET DE L'ÉTHANOL SUR LA FORMATION DU FILM ET SUR L'HYDROPHOBICITÉ DE SURFACE DES LEVURES DANS LE VOILE

Les deux méthodes de mesure d'hydrophobicité sont basées sur des principes différents, ce qui explique les différences d'hydrophobicité de surface observée. La présence d'éthanol dans le milieu de culture se traduit par une modification de l'HSC (figure 2). Bien que l'augmentation de l'HSC mesurée par la méthode de partition de phase ne soit pas toujours significative, elle est répétable. En revanche, lorsque la mesure est réalisée avec des microbilles, c'est pour les concentrations 2 et 10 p. cent d'alcool que l'on observe un changement significatif de l'HSC. Comme le montre la figure 3, l'éthanol favorise la formation du voile pour une concentration supérieure à 4 p. cent d'éthanol. En effet, l'importance de la formation du voile a été estimée en mesurant le nombre de cellules présentes dans celui-ci par rapport au nombre de cellules totales. Ainsi de 0 à 4 p. cent d'éthanol, la proportion de cellules présentes dans le voile n'est que de 15-20 p. cent et au-delà de 4 p. cent d'éthanol la proportion de cellules présentes dans le voile atteint 65-80 p. cent. Bien que la concentration en éthanol induisant une augmentation de l'HSC soit différente de celle favorisant la formation du voile, il semble que l'augmentation de l'HSC induite par l'éthanol contribue à la formation du voile.

Nous avons comparé l'HSC des souches P3, 3079 (souche de vinification ne formant pas de voile) P3 (*rho*$^-$, mutant respiratoire), cultivées sur milieu YPDG. Quelle que soit la méthode utilisée, l'HSC de la souche 3079 est nettement inférieure à celle de la souche P3, 20 p. cent pour 3079 contre 60 p. cent pour P3 (méthode partition dephase et 0 p. cent d'éthanol (figure 4). Bien que nous n'ayons étudié que deux souches, une HSC élevée semble nécessaire à la formation du voile puisque une souche possédant une faible HSC (3079) est incapable de former un voile. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de MARTINEZ *et al.* (1997b). Cependant l'HSC n'est pas le seul déterminant de la formation du voile puisque le mutant respiratoire, qui

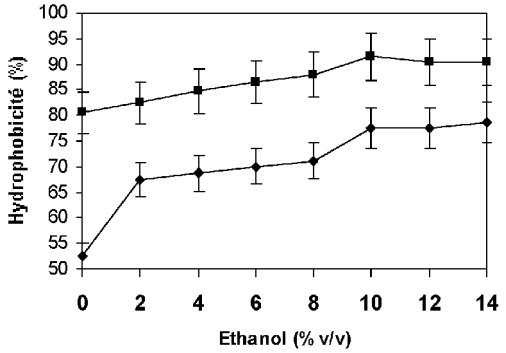


Fig. 2 - Evolution de l'hydrophobicité de surface des cellules présentes dans le voile

La souche *Saccharomyces cerevisiae* P3 est cultivée en milieu de Fornachon en présence de quantités croissantes d'éthanol pendant 15 jours à 25°C. L'HSC est déterminée par la méthode de partition de phase (■) ou la méthode des microbilles paramagnétiques (◆). Les barres verticales correspondent à l'écart type de trois expériences indépendantes.

Fig. 2 - Cell surface hydrophobicity evolution of yeast present in the film.

Saccharomyces cerevisiae strain P3 was grown in Fornachon medium containing increasing ethanol concentrations for 15 days at 25°C. CSH was determined either by phase distribution (■) method or the magnobead assay (◆). Vertical bars indicate standard deviation of three independent experiments.

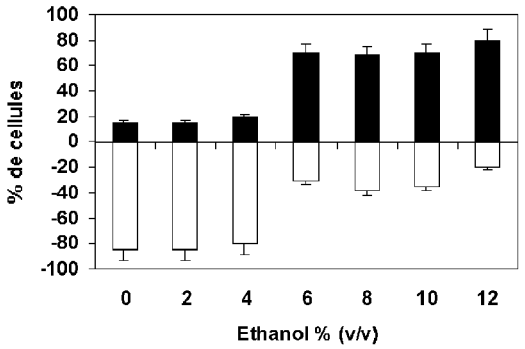


Fig. 3 - Répartition des cellules de levure de la souche P3 entre le voile (■) et le fond (□) pour différentes concentrations d'éthanol

Les barres verticales correspondent à l'écart type de trois expériences indépendantes.

Fig. 3 - Cell yeast distribution of P3 strain between the film (■) and the sediment (□) for different ethanol concentrations

Vertical bars indicate standard deviation of three independent experiments.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

possède une hydrophobicité élevée (60-80 p. cent) et similaire à celle du parent sauvage, ne forme pas de voile. Ces résultats montrent, qu'en plus de l'hydrophobicité de surface, le métabolisme oxydatif des cellules est vraisemblablement essentiel à la formation du voile. L'importance du métabolisme oxydatif dans la formation de voile a également été montrée par d'autres équipes. En effet, la présence de glucose dans le milieu de culture, inhibiteur du métabolisme respiratoire, empêche la formation du voile (MARTINEZ *et al.*, 1997b). IIMURA *et al.* (1980) ont montré que l'acriflavine, qui inhibe l'activité respiratoire, empêche également la formation du voile. Néanmoins, le rôle de l'éthanol est très important, car lorsque P3 est cultivée en présence de glycérol comme seule source de carbone (métabolisme oxydatif), le voile formé est beaucoup moins important que lorsque la source de carbone est constituée d'éthanol (figure 3).

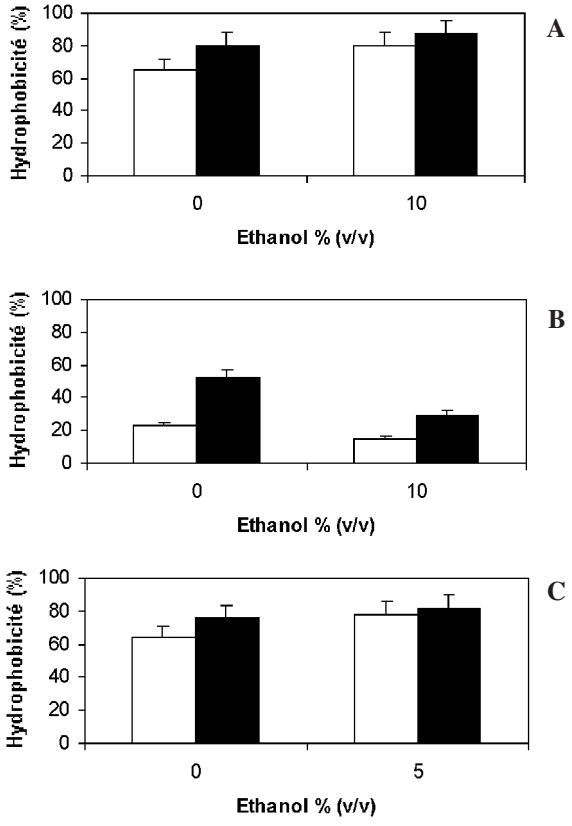


Fig. 4 - HSC de la souche P3 (A), 3079 (B) P3 *rho*⁻ (C) cultivées sur YPDG avec ou sans alcool

L'HSC est déterminée soit par la méthode de partition de phase (■) ou la méthode des microbilles paramagnétiques (□). Les barres verticales correspondent à l'écart type de trois expériences indépendantes.

Fig. 4 - CSH of strain P3 (A), strain 3079 (B) and strain P3 *rho*⁻ (C) cultivated in YPDG medium with or without ethanol

CSH was determined either by the phase distribution method (■) or the magnobead assay (□). Vertical bars indicate standard deviation of three independent experiments.

II - EFFETS DE DIFFÉRENTS TRAITEMENTS SUR L'HYDROPHOBICITÉ DE SURFACE

Le traitement des cellules de levures par un agent réducteur comme le dithiotréitol ne modifie pas l'HSC (figure 5). Ceci indique que les constituants de la paroi qui ne sont pas fixés de façon covalente, ou fixés par des ponts disulfures, ne sont pas responsables de l'HSC.

Par contre, un traitement des parois de levures avec de la lyticase (β-glucanase) entraîne une diminution importante de l'HSC (-70 p. cent) pour les deux souches P3 et P3 (*rho*⁻) et, dans une moindre importance, une diminution de l'HSC (-20 p. cent) pour la souche 3079. Ces résultats indiquent clairement que des constituants pariétaux, dégradés par la lyticase, fixés de façon covalente à la paroi ou insérés dans le réseau de glucane sont responsables de l'HSC.

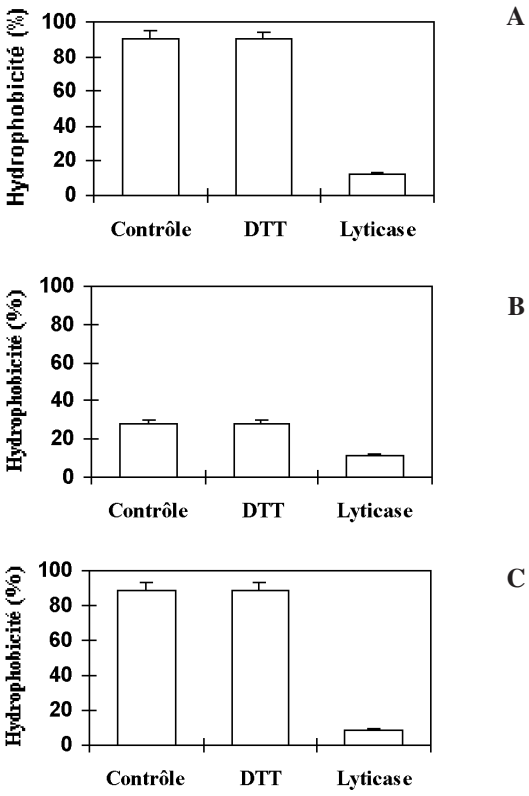


Fig. 5 - Effet du dithiotréitol (DTT) et de la lyticase sur l'HSC déterminée par la méthode de partition de phase des souches P3 (A), 3079 (B) et P3 *rho*⁻ (C)

Les barres verticales correspondent à l'écart type de trois expériences indépendantes.

Fig. 5 - Effect of dithiotreitol DTT and lyticase treatment on the CSH determined by the partition phase method of strain P3 (A), strain 3079 (B) and strain P3 *rho*⁻ (C)

Vertical bars indicate standard deviation of three independent experiments.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

CONCLUSION

Dans cette étude, l'utilisation de deux méthodes de mesures de l'hydrophobicité de surface différentes nous a permis de montrer, pour la première fois, que l'éthanol constitue un inducteur de l'hydrophobicité de surface des cellules de levures. La formation du voile semble favorisée par une hydrophobicité de surface élevée et pourrait participer à l'adaptation des levures à des teneurs élevées en éthanol. Afin de confirmer cet effet de l'éthanol, une caractérisation des composés pariétaux responsables de l'hydrophobicité des levures de voile est en cours.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUBOIS P., RIGAUD J. and DEKIMPE J., 1976. Identification of 4,5-dimethyltetrahydrofurandione-2,3 in vin jaune. *Lebensm.Wiss.Technol*., **9**. 366-368.

FORNACHON J.C.M., 1953. Studies on the sherry flor. Adelaide : Australian wine board.

IBEAS J.I., LOZANO I., PERDIGONES F. and JIMENEZ J., 1997. Dynamics of flor yeast populations during the biological aging of sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 775-79.

IIMURA Y., HARA S. and OTSUKA K., 1980. Cell surface hydrophobicity as a pellicle formation factor in film strain of *Saccharomyces*. *Appl. Biol. Chem*., **44**, 1215-1222.

JIMENEZ J. and BENITEZ T., 1988. Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Current Genetics*, **13**, 461-469.

MARTINEZ P., PEREZ RODRIGUEZ L. and BENITEZ T., 1997a. Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48** , 160-168.

MARTINEZ P., PEREZ RODRIGUEZ L. and BENITEZ T., 1997b. Velum formation by flor yeasts isolated from Sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 55-62.

ROSENBERG M., GUTNICK D. and ROSENBERG E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbon : A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, **9**, 29-33.

STRAVER M.H. and KIJNE J. W., 1996. A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. *Yeast*, **12**, 207-213.

Reçu le 30 avril 98 ; révisé le 4 février 1999 ;
accepté pour publication le 12 février 1999.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)