Connaissance Vigne Vin, 1987, **21,** N° 3, 141-162.

INCIDENCE DE LA CONSERVATION EN PRÉSENCE DE LEVURES SUR LA COMPOSITION DES VINS MOUSSEUX

Angela SILVA, M. Daria FUMI, Guiliana MONTESISSA,
Maria-Grazia COLOMBI et O. COLAGRANDE

Istituto di Enologia, Facoltà di Agraria
Università Cattolica Sacro Cuore, Piacenza (Italie)

INTRODUCTION

Les études consacrées à la conservation des vins mousseux en bouteilles ont donné, parfois, des résultats très différents les uns des autres. Selon certains auteurs (USSEGLIO-TOMASSET et *al.*, 1983; USSEGLIO-TOMASSET, 1985; MARGHERI et *al.*, 1984), les caractères organoleptiques typiques des vins mousseux vieillis en présence de levures sont dus à l'évolution chimique des composés du bouquet, sans intervention d'activités enzymatiques cellulaires. D'autres (FEUILLAT, 1981; FEUILLAT, 1985; MOLNAR et *al.,* 1980; MOLNAR et *al.*, 1981; SUOMALAINEN et LEHTONEN, 1979; LOYAUX et *al.*, 1981; MONTEDORO, 1986) montrent que les échanges qui interviennent au cours du contact entre le vin mousseux et le dépôt de levures ont, vis-à-vis des caractères organoleptiques et de la qualité du produit fini, une incidence considérable; ces mêmes auteurs supposent, d'autre part, que pendant la conservation du vin sur lies, les cellules de levures passent par une phase de latence puis par une phase d'autolyse.

Au cours de ce phénomène d'autolyse, des études conduites sur les bières (CHEN et *al.*, 1980) ont montré que, au cours du contact de la bière avec une quantité assez importante de levures, il se produisait une libération d'acides gras, essentiellement en C8 et C10. Ce phénomène peut intervenir par chauffage, par variation du pH, par addition d'éthanol ou d'autres solvants organiques, mais il est difficilement décelable dans les conditions normales d'élaboration des bières.

Depuis quelques années, nous étudions les composés azotés des vins mousseux et leur influence sur la qualité du vin (COLAGRANDE et SILVA, 1981; COLAGRANDE et *al.*, 1984). Nous avons montré que la conservation du vin mousseux en présence de levures entraîne une redistribution des fractions azotées et induit une variation du rapport entre l'azote macromoléculaire et l'azote soluble, avec une augmentation de ce dernier.

TABLEAU I

Protocole technologique des essais.

	Essai A (100 hl)	Essais B_1 et B_2 (200 hl)	Essais C_1 (100 hl)	Essai C_2 (100 hl)
Vins de base	Chardonnay 80 % Pinot blanc 20 %	Pinot noir 85 % Pinot gris 15 %	Pinot noir 70 % Pinot blanc et gris 30 %	Pinot noir 70 % Pinot blanc et gris 30 %
Souches de Levure	Saccharomyces cerevisiae	Saccharomyces bayanus	Saccharomyces bayanus	Saccharomyces bayanus
Nombre de cellules par ml	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Saccharose (g/l)	30	25	25	25
Adjuvants (dosé par hl)	Bentonite + gel de silice (clarifiant S) 0,05 litres	Bentonite (2,5 g)	Bentonite + gel de silice (clarifiant S) 0,06 litres	
Sel d'ammonium	Phosphate Mazur (2 l/100 hl)	Phosphates et Sulfates (25 g/hl)	Phosphates (11 g/hl)	
Thiamine (mg/l)		0,6		

	Essai A	Essai B_1	Essai B_2	Essai C_1	Essai C_2
Durée de la prise de mousse (jours)	60	50	50	30	30
Durée globale de conservation sur levures (jours)	810	800	250	780	780 (230)*
Température de fermentation et de conservation (° C)	13–15	14–15	14–15	16–18	16–18

Essais A, B_1 et C_1 : le vin mousseux est produit en bouteille.
Essais B_2 et C_2 : le vin mousseux est produit en cuve close.

* Après 230 jours, 5 hl de l'essai C_2 sont séparés des levures et embouteillés isobariquement. Le vin mousseux obtenu est conservé en bouteille pendant les 550 jours successifs.

Dans ce travail, nous étudions les modifications provoquées par la conservation du vin mousseux en présence de levures, des points de vue suivants : évolution des composés azotés et aromatiques des vins, modification des activités protéasique A et estérasique intracellulaires, variation des protéines intracellulaires.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Les vins mousseux étudiés proviennent de trois caves et ont été élaborés suivant le protocole décrit dans le tableau I. Au cours de cette élaboration, on effectue périodiquement des prélèvements pour analyse. Dans les essais en cuve close, les échantillons ont été prélevés après homogénéisation des vins.

II. — MÉTHODES ANALYTIQUES.

a) *Vins mousseux*

— Dosage de l'azote total (méthode Kjeldhal)

— Dosage de l'azote ammoniacal (Recueil des Méthodes Internationales d'Analyses des Vins, O.I.V. 1972)

— Dosage des aminoacides par chromatographie liquide à haute performance (CASOLI et COLAGRANDE, 1981)

— Fractionnement et dosage des protéines : 2 litres de vin sont soumis à une ultrafiltration et à une dialyse, au moyen d'un système modulaire à flux tangentiel, équipé de membranes Pellicon (Millipore) avec un seuil de coupure de PM 10^4. Sur le concentrat lyophilisé on dose les protéines exprimées en sérumalbumine (SCHACTERLE et POLLACH, 1973). Cette méthode est très reproductible (sur 4 répétitions le coefficient de variation est de 2 p. 100) si l'on utilise les mêmes dilutions. Dans le cas contraire, le coefficient de variation peut atteindre 10 p. 100. Pour éliminer les erreurs dues à la présence de polymères tanniques dans le concentrat, le dosage est effectué en utilisant une courbe-étalon et la méthode des ajouts.

— Dosage des composés aromatiques par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (MARGHERI et VERSINI, 1979).

b) *Levures*

La numération des levures totales est obtenue par hématimétrie au moyen d'une cellule de Burker. Les levures vivantes sont dénombrées après développement sur boîte de Petri contenant un milieu Agar-levure et Malt (Difco). Pour chaque essai, les résultats représentent la moyenne de ceux obtenus sur six bouteilles séparées, qui ont été homogénéisées très soigneusement avant prélèvement.

TABLEAU II

Caractères analytiques des vins de base et des vins mousseux élaborés en bouteille (essais A, B_1 et C_1) et en cuve close (essais B_2 et C_2).

		ESSAI A		ESSAI B_1		ESSAI B_2	ESSAI C_1		ESSAI C_2
		vin base	vin mousseux (810 j.)	vin base	vin mousseux (800 j.)	vin mousseux (250 j.)	vin base	vin mousseux (780 j.)	vin mousseux (780 j.)
Titre alcoométrique	vol. %	10,32	11,96	11,35	12,90	12,88	10,61	12,10	12,04
Sucres réducteurs	g/l	2,00	1,20	1,90	1,10	1,60	1,40	1,05	1,10
Extrait non réducteur	g/l	18,52	18,60	18,00	18,65	19,20	18,15	20,30	18,85
Cendres	g/l	1,09	1,09	1,13	1,22	1,17	1,18	1,14	1,15
Alcalinité des cendres	meq/l	10,00	12,00	9,50	10,00	10,50	13,50	13,00	13,00
pH		3,02	3,00	2,90	2,96	3,00	2,95	2,97	2,95
Acidité totale (en acide tartrique)	g/l	7,83	7,74	6,90	6,76	6,69	7,36	6,86	7,04
Acidité volatile (en acide acétique)	g/l	0,40	0,41	0,39	0,39	0,45	0,24	0,28	0,29
Acide tartrique	g/l	2,18	2,02	3,60	3,50	3,53	3,56	2,94	3,05
Acide malique	g/l	1,22	1,26	0,86	0,82	0,74	1,07	1,08	1,05
Acide lactique	g/l	2,10	1,92	0,21	0,29	0,28	0,95	1,22	1,08
Acide citrique	g/l	0,56	0,53	0,28	0,28	0,25	0,21	0,25	0,26
Acide succinique	g/l	0,29	0,31	0,43	0,46	0,46	0,56	0,51	0,50
SO_2 libre	mg/l	7	7	8	8	7	6	8	9
SO_2 total	mg/l	68	69	70	68	63	88	73	74
Glycérine	g/l	5,99	5,26	6,50	6,19	6,65	6,15	5,95	5,89
Azote total	mg/l	342	337	210	227	227	174	187	184
Pression de CO_2 à 20° C	atm		7,0		6,0	5,5		6,0	5,5

La structure cellulaire des levures est observée au microscope électronique à transmission (Elmiskop 1 A, Siemens).

Les dosage des protéines et des activités enzymatiques intracellulaires est réalisé comme suit : le dépôt de six bouteilles du même lot est séparé par centrifugation, lavé et assemblé ; deux grammes, environ, de ce dépôt sont prélevés, remis en suspension dans de l'eau distillée et stérile (4 ml) et broyés en présence de billes de verre (16 g) (de diamètre 0,22 mm), à 4° C pendant 30 minutes dans un broyeur Mickle (Service Technique de l'Université Catholique de Piacenza). Le broyat de cellules est centrifugé, (1500 g, 15 minutes, 4° C) ; le surnageant est dialysé contre de l'eau courante pendant 24 heures puis contre de l'eau distillée pendant 40 heures et enfin lyophilisé.

Les protéines sont dosées sur le lyophilisat (SCHACTERLE et POLLACH 1973). L'activité estérasique intracellulaire est évaluée selon BIER (1955) et PARKINEN et *al.* (1978), en utilisant le p. nitrophényl acétate comme substrat.

La protéase A, une endopeptidase dégradant les composés azotés cellulaires tels que les polypeptides qui sont formés par d'autres protéases vacuolaires (JONES, 1984 ; HOUGH et MADDOX, 1970) est activée par digestion protéolytique des inhibiteurs spécifiques, en traitant les extraits cellulaires à 37° C pendant 18 heures à pH 5,0 (WOLF et *al.*, 1978 ; FEUILLAT, 1981). L'activité protéasique est ensuite déterminée selon DRAPEAU (1976) avec l'hémoglobine comme substrat.

La préparation des protoplastes (KITAMURA et *al.*, 1971) est réalisée par dégradation de la paroi cellulaire au moyen de Zymolase 20T (Miles). Le dépôt des six bouteilles constituant l'échantillon étudié est séparé par centrifugation, lavé et assemblé. Une partie aliquote est remise en suspension (2 mg de poids sec par ml de solution). Trois ml de cette suspension reçoivent ensuite 5 ml de tampon phosphate M/15, pH 7,5, 1 ml de Zymolase 20T (0,5 mg/ml) et une quantité suffisante de sorbitol pour obtenir une concentration finale de 1M.

Ce mélange est placé à 30° C pendant 1 heure au bain-marie équipé d'un agitateur, puis centrifugé. Le résidu est lavé et remis en suspension dans le tampon phosphate contenant le sorbitol. Le nombre de protoplastes est obtenu par dénombrement au microscope optique avant et après la lyse de la paroi cellulaire. Cette méthode est vérifiée sur la même souche de levures en croissance exponentielle suivant les conditions de KUO et YAMAMOTO (1975), en obtenant 98 p. 100 de protoplastes.

RÉSULTATS

I. — ÉVOLUTION DE LA COMPOSITION DES VINS MOUSSEUX PENDANT LEUR ÉLABORATION.

Les caractères généraux des vins de base et des vins mousseux correspondants (tableau II) ne montrent aucune différence significative, exception faite de l'évolution consécutive à la refermentation.

TABLEAU III

Variation des acides aminés, de l'azote aminé et de l'azote ammoniacal pendant la prise de mousse.

Les résultats sont exprimés en mg par litre. Entre parenthèses sont indiquées les variations, en pourcentage, par rapport au tirage.

	ESSAI A		ESSAI B_1		ESSAI B_2	ESSAI C_1		ESSAI C_2
	Elaboration en bouteille		Elaboration en bouteille		Elaboration en cuve close	Elaboration en bouteille		Elaboration en cuve close
	vin* base	fin de prise de mousse	vin* base	fin de prise de mousse	fin de prise de mousse	vin* base	fin de prise de mousse	fin de prise de mousse
Histidine	44,76	35,01 (– 22 %)	40,27	40,42	43,95 (+ 9 %)	48,20	41,07 (– 15 %)	43,90 (– 9 %)
Asparagine	37,59	28,03 (– 25 %)	12,74	12,82 (+ 1 %)	12,66 (– 1 %)	8,25	7,25 (– 12 %)	4,15 (– 50 %)
Arginine	133,25	139,24 (+ 4 %)	73,52	74,39 (+ 1 %)	69,10 (– 6 %)	34,93	38,04 (+ 9 %)	28,82 (– 17 %)
Acide aspartique + Acide glutamique	40,89	40,57 (– 1 %)	22,69	16,14 (– 29 %)	13,11 (– 42 %)	21,99	17,91 (– 19 %)	14,86 (– 32 %)
Glycine	26,33	19,67 (– 25 %)	22,25	17,76 (– 20 %)	18,81 (– 15 %)	20,83	18,12 (– 13 %)	15,53 (– 25 %)
Alanine	266,91	222,73 (– 17 %)	65,54	39,70 (– 39 %)	38,04 (– 42 %)	58,07	42,48 (– 27 %)	28,50 (– 51 %)
Acide γ-aminobutyrique	108,30	103,25 (– 4 %)	104,99	104,16 (– 1 %)	103,64 (– 1 %)	85,46	78,37 (– 8 %)	83,27 (– 3 %)
Proline	562,76	557,89 (– 1 %)	194,88	190,92 (– 2 %)	190,82 (– 2 %)	282,63	287,18 (+ 2 %)	279,83 (– 1 %)
Valine	16,94	15,80 (– 7 %)	7,88	5,45 (– 31 %)	5,22 (– 34 %)	6,55	5,60 (– 14 %)	3,86 (– 41 %)
Phénylalanine	11,88	11,59 (– 2 %)	7,17	7,92 (+ 10 %)	7,45 (+ 4 %)	7,93	7,45 (– 6 %)	5,35 (– 32 %)
Isoleucine	18,10	16,40 (– 9 %)	9,94	11,42 (+ 15 %)	11,11 (+ 12 %)	8,28	10,17 (+ 23 %)	8,78 (+ 6 %)
Leucine	10,37	9,40 (– 9 %)	6,41	3,95 (– 38 %)	3,17 (– 50 %)	4,28	3,81 (– 11 %)	1,47 (– 66 %)
Ornithine	6,26	7,45 (+ 19 %)	7,26	8,81 (+ 21 %)	8,86 (+ 22 %)	9,70	9,01 (– 7 %)	9,07 (– 6 %)
Lysine	14,85	12,31 (– 17 %)	14,53	10,81 (– 26 %)	10,61 (– 27 %)	13,66	14,97 (+ 10 %)	11,26 (– 18 %)
Tyrosine	7,06	10,86 (+ 54 %)	7,40	10,36 (+ 40 %)	10,75 (+ 45 %)	9,26	9,51 (+ 3 %)	7,87 (– 15 %)
Azote aminé	208,29	195,70 (– 6 %)	100,38	94,13 (– 6 %)	92,62 (– 8 %)	95,63	90,83 (– 5 %)	83,11 (– 13 %)
Azote ammoniacal	16,0	4,4 (– 73 %)	59,5	44,5 (– 25 %)	45,2 (– 24 %)	30 (5,4)**	15,1 (– 50 %)	4,9 (– 9 %)

* L'analyse a été effectué sur le vin de base prêt pour la prise de mousse.

** Dans le 3e essai en cuve close, l'azote ammoniacal n'est pas ajouté.

TABLEAU IV

Variation des acides aminés, de l'azote aminé et de l'azote ammoniacal pendant les premiers 200 jours de conservation sur levures après la fin de prise de mousse.

Les résultats sont exprimés en mg par litre. Entre parenthèses sont indiquées les variations, en pourcentage, par rapport au vin à la fin de la prise de mousse.

	ESSAI A		ESSAI B_1		ESSAI B_2		ESSAI C_1		ESSAI C_2	
	Bouteille		Bouteille		Cuve close		Bouteille		Cuve close	
	Fin de prise de mousse	200 jours	Fin de prise de mousse	200 jours	Fin de prise de mousse	200 jours	Fin de prise de mousse	200 jours	Fin de prise de mousse	200 jours
Histidine	35,01	28,11 (– 20 %)	40,42	24,30 (– 40 %)	43,95	29,60 (– 33 %)	41,07	33,57 (– 18 %)	43,90	39,38 (– 10 %)
Asparagine	28,03	24,72 (– 12 %)	12,82	17,38 (+ 36 %)	12,66	17,68 (+ 40 %)	7,25	13,70 (+ 89 %)	4,15	7,78 (+ 87 %)
Arginine	139,24	194,59 (+ 40 %)	74,39	101,43 (+ 36 %)	69,10	99,00 (+ 43 %)	38,04	44,92 (+ 18 %)	28,82	44,32 (+ 54 %)
Acide aspartique + Acide glutamique	40,57	78,13 (+ 93 %)	16,14	20,88 (+ 29 %)	13,11	20,43 (+ 56 %)	17,91	21,99 (+ 23 %)	14,86	17,20 (+ 16 %)
Glycine	19,67	26,45 (+ 34 %)	17,76	23,64 (+ 33 %)	18,81	23,82 (+ 27 %)	18,12	25,80 (+ 42 %)	15,53	21,75 (+ 40 %)
Alanine	222,73	274,87 (+ 23 %)	39,70	68,09 (+ 71 %)	38,04	65,13 (+ 71 %)	42,48	70,18 (+ 65 %)	28,50	50,72 (+ 78 %)
Acide γ-aminobutyrique	103,25	114,39 (+ 11 %)	104,16	118,31 (+ 14 %)	103,64	115,96 (+ 12 %)	78,37	78,42	83,27	81,41 (– 2 %)
Proline	557,89	582,65 (+ 4 %)	190,92	201,76 (+ 6 %)	190,82	204,02 (+ 7 %)	287,18	265,60 (– 7 %)	279,83	261,72 (– 6 %)
Valine	15,80	17,78 (+ 12 %)	5,45	7,91 (+ 45 %)	5,22	8,16 (+ 56 %)	5,60	7,44 (+ 33 %)	3,86	6,80 (+ 76 %)
Phénylalanine	11,59	15,60 (+ 35 %)	7,92	8,77 (+ 11 %)	7,45	8,56 (+ 15 %)	7,45	7,69 (+ 3 %)	5,35	5,72 (+ 7 %)
Isoleucine	16,40	18,32 (+ 12 %)	11,42	9,43 (– 17 %)	11,11	8,97 (– 19 %)	10,17	11,16 (+ 10 %)	8,78	8,24 (– 6 %)
Leucine	9,40	10,48 (+ 11 %)	3,95	5,99 (+ 52 %)	3,17	4,81 (+ 52 %)	3,81	6,13 (+ 61 %)	1,47	3,76 (+ 15 %)
Ornithine	7,45	6,87 (– 8 %)	8,81	10,64 (+ 21 %)	8,86	9,49 (+ 7 %)	9,01	11,08 (+ 23 %)	9,07	9,46 (+ 4 %)
Lysine	12,31	13,48 (+ 9 %)	10,81	12,50 (+ 16 %)	10,61	10,65	14,97	16,69 (+ 11 %)	11,26	14,62 (+ 30 %)
Tyrosine	10,86	12,82 (+ 18 %)	10,36	12,00 (+ 16 %)	10,75	11,91 (+ 11 %)	9,51	8,01 (– 16 %)	7,87	12,67 (+ 61 %)
Azote aminé	195,70	230,09 (+ 18 %)	94,13	109,88 (+ 17 %)	92,62	109,28 (+ 18 %)	90,83	97,20 (+ 7 %)	83,11	91,79 (+ 10 %)
Azote ammoniacal	4,4	9,3 (+ 111 %)	44,5	49,9 (+ 12 %)	45,2	48,6 (+ 7 %)	15,1	19,3 (+ 28 %)	4,9	5,8 (+ 18 %)

a) *Constituants azotés*

Comme le montrent les chiffres du tableau III, il se produit au cours de la prise de mousse, une diminution de 9 à 73 p. 100 de l'azote ammoniacal ; en revanche, les diminutions d'azote aminé sont, dans tous les essais, limitées (de 5 à 13 p. 100 selon les lots). La diminution la plus importante correspond au lot n'ayant pas reçu d'azote ammoniacal (essai C2).

Le tableau IV montre qu'après les 200 premiers jours de conservation, les teneurs en azote aminé deviennent peu différentes de celles des vins de base correspondants. Tant dans les essais en bouteilles que dans ceux en cuve close la plupart des amino-acides augmentent.

TABLEAU V

Variation des teneurs en acides aminés pendant la conservation des vins mousseux sur levures à partir de 200 jours après la fin de la prise de mousse.

Les résultats sont exprimés en mg par litre. Entre parenthèses sont indiqués les variations, en pourcentage, par rapport en vin mousseux conservé pendant 200 jours.

	ESSAI A			ESSAI B_1	
	Bouteille			Bouteille	
	200 jours	500 jours	750 jours	200 jours	750 jours
Histidine	28,11	27,18 (— 3 %)	26,57 (— 5 %)	24,30	27,78 (+ 14 %)
Asparagine	24,72	28,43 (+ 15 %)	24,89 (+ 1 %)	17,38	21,83 (+ 26 %)
Arginine	194,59	170,38 (— 12 %)	161,30 (— 17 %)	101,43	83,29 (— 18 %)
Acide aspartique + Acide glutamique	78,13	78,94 (+ 1 %)	78,97 (+ 1 %)	20,88	16,50 (— 21 %)
Glycine	26,45	26,96 (+ 2 %)	25,43 (— 4 %)	23,64	28,08 (+ 19 %)
Alanine	274,87	294,94 (+ 7 %)	268,15 (— 2 %)	68,09	62,27 (— 8 %)
Acide γ-aminobutyrique	114,39	102,63 (— 10 %)	96,38 (— 16 %)	118,31	100,10 (— 15 %)
Proline	582,65	576,50 (— 1 %)	567,80 (— 2 %)	201,76	202,98 (+ 1 %)
Valine	17,78	17,10 (— 4 %)	17,19 (— 3 %)	7,91	9,25 (+ 17 %)
Phénylalanine	15,60	14,50 (— 7 %)	14,58 (— 6 %)	8,77	9,19 (+ 5 %)
Isoleucine	18,32	19,75 (+ 8 %)	19,65 (+ 7 %)	9,43	10,01 (+ 6 %)
Leucine	10,48	10,97 (+ 5 %)	11,25 (+ 7 %)	5,99	6,19 (+ 3 %)
Ornithine	6,87	7,20 (+ 5 %)	7,44 (+ 8 %)	10,64	8,85 (— 17 %)
Lysine	13,48	12,44 (— 8 %)	13,28 (— 1 %)	12,50	12,16 (— 3 %)
Tyrosine	12,82	7,41 (— 42 %)	6,53 (— 49 %)	12,00	13,75 (+ 15 %)
Azote aminé	230,09	223,26 (— 3 %)	213,20 (— 7 %)	109,88	103,01 (— 6 %)

TABLEAU VI

Variation des teneurs en acides aminés pendant la conservation des vins mousseux sur levures à partir de 200 jours après la fin de la prise de mousse.

Les résultats sont exprimés en mg par litre. Entre parenthèses sont indiquées les variations, en pourcentage, par rapport au vin mousseux de 200 jours.

	ESSAI C_1			ESSAI C_2		
	bouteille			cuve close		
	200 jours	500 jours	750 jours	200 jours	500 jours	750 jours
Histidine	33,57	33,70	16,76 (— 50 %)	39,38	34,72 (— 12 %)	26,30 (— 33 %)
Asparagine	13,70	14,42 (+ 5 %)	14,45 (+ 5 %)	7,78	11,32 (+ 46 %)	11,39 (+ 46 %)
Arginine	44,92	45,17 (+ 1 %)	44,82	44,32	40,93 (— 8 %)	46,97 (+ 6 %)
Acide aspartique + Acide glutamique	21,99	20,91 (— 5 %)	19,08 (— 13 %)	17,20	16,46 (— 4 %)	16,59 (— 3 %)
Glycine	25,80	25,49 (— 1 %)	26,40 (+ 2 %)	21,75	23,50 (+ 8 %)	26,45 (+ 22 %)
Alanine	70,18	72,00 (+ 3 %)	69,54 (— 1 %)	50,72	50,88	49,59 (— 2 %)
Acide γ-aminobutyrique	78,42	79,95 (+ 2 %)	75,63 (— 4 %)	81,41	79,16 (— 3 %)	73,70 (— 9 %)
Proline	265,60	267,35 (+ 1 %)	258,59 (— 3 %)	261,72	259,13 (— 1 %)	265,04 (+ 1 %)
Valine	7,44	8,49 (+ 14 %)	8,95 (+ 20 %)	6,80	6,86 (+ 1 %)	7,10 (+ 4 %)
Phénylalanine	7,69	8,87 (+ 15 %)	9,96 (+ 29 %)	5,72	6,76 (+ 18 %)	9,33 (+ 63 %)
Isoleucine	11,16	12,02 (+ 8 %)	13,47 (+ 21 %)	8,24	9,14 (+ 11 %)	10,07 (+ 22 %)
Leucine	6,13	6,47 (+ 5 %)	6,84 (+ 12 %)	3,76	4,39 (+ 17 %)	4,87 (+ 29 %)
Ornithine	11,08	10,91 (— 2 %)	10,70 (— 3 %)	9,46	9,42	8,72 (— 8 %)
Lysine	16,69	17,38 (+ 4 %)	17,84 (+ 7 %)	14,62	15,17 (+ 4 %)	14,65
Tyrosine	8,01	9,48 (+ 18 %)	8,87 (+ 11 %)	12,67	11,80 (— 7 %)	9,06 (— 28 %)
Azote aminé	97,20	95,57 (— 2 %)	92,17 (— 5 %)	91,79	90,10 (— 2 %)	90,07 (— 2 %)

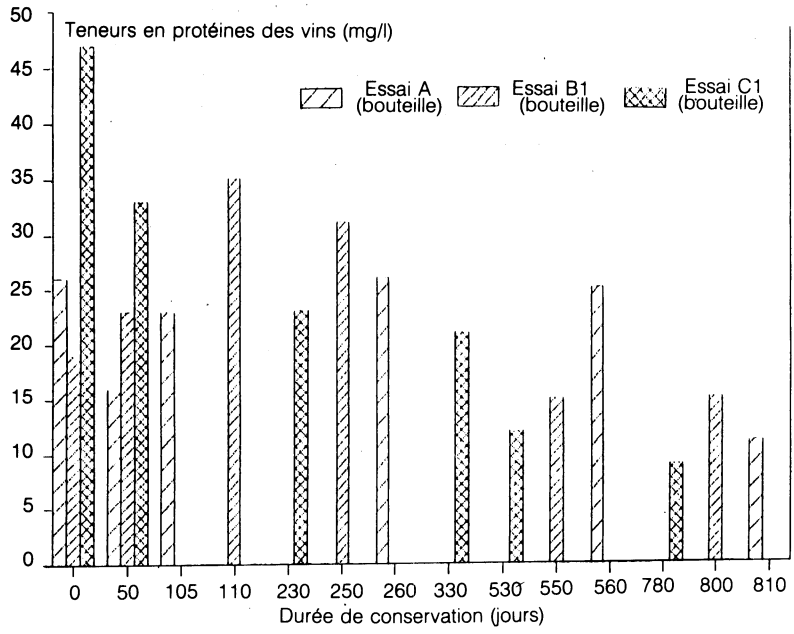


Fig. 1. — Évolution des protéines (p.m. ⩾ 10000) des vins, au cours de la prise de mousse et de la conservation sur levures en bouteille.

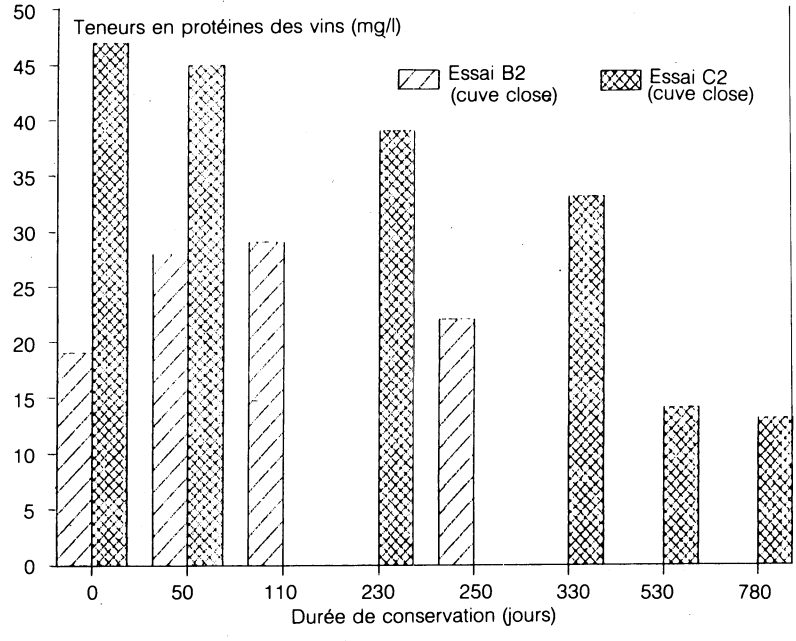


Fig. 2. — Évolution des protéines (p.m. ⩾ 10000) des vins, au cours de la prise de mousse et de la conservation sur levures en cuve close.

Ces variations s'observent dans un délai de 2 à 3 mois après la fin de la prise de mousse ; par la suite, jusqu'à 200 jours de conservation, les teneurs restent constantes. Au-delà, alors que les formes ammoniacale et aminé de l'azote ne varient pas, les teneurs en acides aminés subissent diverses modifications, variables suivant les composés (tableau V et VI).

Certains acides aminés (ornithine, lysine, alanine) ne subissent plus de variations, tandis que d'autres ont leur teneur qui se modifie dans le temps. Par exemple l'histidine diminue et l'asparagine augmente jusqu'à 16 mois et ne varie plus par la suite. La glycine, la valine, l'isoleucine, la leucine et la phénylalanine évoluent comme l'asparagine.

Les diminutions des teneurs en histidine et tyrosine notées dans quelques essais ne peuvent pas être attribuées à l'activité des bactéries lactiques dont nous n'avons jamais relevé la présence.

Dans les quatre essais, et dans le premier en particulier, on n'observe pas les mêmes modifications. Ce fait peut être attribué à la différente composition du vin de base et à l'emploi des souches de levures différentes qui entraînent une modification dans l'évolution des acides aminés pendant la prise de mousse et la conservation.

En ce qui concerne les protéines (figures 1 et 2), leur concentration varie en fonction de la durée de conservation. Entre 7 et 8 mois après la fin de la refermentation, les teneurs sont peu différentes de celles du vin de base, sauf dans le troisième essai. Au-delà on observe une diminution considérable, peut-être en relation avec un lent processus d'insolubilisation des composés macromoléculaires ou avec leur hydrolyse enzymatique.

b) *Composés aromatiques*

Leur évolution a été suivie à partir du 7e mois de conservation en présence ou non de levures (tableau VII et VIII). Les composés aromatiques évoluent différemment dans les quatre essais, sauf que pour le succinate de diéthyle, l'acétate d'isoamyle et les acides volatils. Le succinate de diéthyle augmente, tandis que l'acétate d'isoamyle diminue en présence et en absence de levures, mais les variations quantitatives en présence de levures sont plus élevées. Les acides volatils augmentent surtout dans les vins mousseux conservés sur levures.

L'ensemble des résultats montre que le vieillissement prolongé du vin mousseux en présence ou non de levures entraîne une modification du rapport des teneurs entre les divers esters, accompagnée d'une augmentation des composés les moins volatils. Ceci influe à la fois sur l'arôme et sur le goût.

Il semble également que les variations quantitatives de certains composés de l'arôme, différentes en présence et en absence des levures, sont reliées à la présence de levures, ce qui confirme des résultats précédents (FEUILLAT, 1981 ; MOLNAR et *al.*, 1980 ; LOYAUX et *al.*, 1981 ; CHEN et *al.*, 1980).

TABLEAU VII

Variation des composés aromatiques pendant la conservation des vins mousseux après la fin de la prise de mousse.

Les résultats sont exprimés en mg par litre.

Entre parenthèses sont indiqués les variations, en pourcentage, par rapport au vin mousseux de 200 jours.

	ESSAI A		ESSAI B_1	
	Bouteille		Bouteille	
	200 jours	750 jours	200 jours	750 jours
Butyrate d'éthyle	0,36	0,33 (— 8 %)	0,29	0,23 (— 21 %)
Pyruvate d'éthyle	1,40	1,75 (+ 25 %)	1,12	0,67 (— 40 %)
Caproate d'éthyle	0,73	0,56 (— 23 %)	0,50	0,41 (— 18 %)
Lactate d'éthyle	253,47	252,78	58,50	72,77 (+ 24 %)
Caprate d'éthyle	n. d.	traces	0,13	0,10 (— 23 %)
Laurate d'éthyle	0,48	0,48	0,57	1,44 (+ 153 %)
Succinate de diéthyle	2,03	4,44 (+ 119 %)	3,61	7,52 (+ 108 %)
Acétate d'éthyle	50,0	52,0	77,0	68,0 (— 12 %)
Acétate d'isobutyle	traces	traces	0,05	traces
Acétate d'isoamyle	0,37	0,14 (— 62 %)	0,37	0,14 (— 62 %)
Acide isovalérianique	0,68	0,56 (— 18 %)	0,56	0,74 (+ 32 %)
Acide caproïque	3,22	3,24	3,71	5,19 (+ 40 %)
Acide caprylique	3,50	2,81 (— 20 %)	4,00	3,57 (— 11 %)
ACIDES TOTAUX	7,40	6,61 (— 11 %)	8,27	9,50 (+ 15 %)
Butanol-1	0,99	0,96	1,11	0,90 (— 19 %)
Hexanol	2,06	2,32 (+ 13 %)	0,68	0,67
Phényl-2-éthanol	13,48	12,42 (— 8 %)	47,72	45,85
Propanol	28,0	24,0 (— 14 %)	26,0	26,0
Méthyl-2-propanol-1	53,0	54,0	71,0	66,0
Méthyl-2 + Méthyl-3 butanol-1	93,0	96,0	108,0	106,0
Acétaldéhyde	62,57	63,0	99,24	116,19 (+ 17 %)
γ-butyrolactone	10,81	9,68 (— 10 %)	10,30	13,96 (+ 35 %)

n.d. : non dosable.

TABLEAU VIII

Variation des composés aromatiques pendant la conservation des vins mousseux avec ou sans levures à partir de 200 jours après la fin de la prise de mousse.

Les résultats sont exprimés en mg par litre.
Entre parenthèses sont indiquées les variations, en pourcentage, par rapport au vin mousseux de 200 jours.

	ESSAI C_1		ESSAI C_2		
	Bouteille		Cuve close		
	200 jours	750 jours	200 jours	750 jours	200 jours avec levures + 550 jours sans levures en bouteille
Butyrate d'éthyle	0,18	0,23 (+ 28 %)	0,31	0,29	0,38 (+ 23 %)
Pyruvate d'éthyle	1,03	0,97	1,68	1,48 (— 12 %)	1,57 (— 6 %)
Caproate d'éthyle	0,29	0,47 (+ 62 %)	0,66	0,47 (— 29 %)	0,65
Lactate d'éthyle	163,25	171,64	174,53	202,46 (+ 16 %)	170,37
Caprate d'éthyle	0,24	0,12 (— 50 %)	0,69	0,18 (— 74 %)	0,29 (— 58 %)
Laurate d'éthyle	0,52	0,55	0,61	0,97 (+ 59 %)	0,57
Succinate de diéthyle	4,38	9,21 (+110 %)	3,63	6,87 (+ 89 %)	4,89 (+ 35 %)
Acétate d'éthyle	47,0	41,0 (— 13 %)	50,0	45,0 (— 10 %)	48,0 (— 4 %)
Acétate d'isobutyle	traces	traces	0,12	traces	traces
Acétate d'isoamyle	0,14	0,08 (— 43 %)	0,30	0,13 (— 57 %)	0,22 (— 27 %)
Acide isovalérianique	0,60	0,61	0,67	0,81 (+ 21 %)	0,58 (— 13 %)
Acide caproïque	4,47	5,19 (+ 16 %)	4,40	5,29 (+ 20 %)	3,78 (— 14 %)
Acide caprylique	4,64	6,56 (+ 41 %)	5,04	6,80 (+ 35 %)	6,06 (+ 20 %)
ACIDES TOTAUX	9,71	12,36 (+ 27 %)	10,11	12,90 (+ 28 %)	10,42 (+ 3 %)
Butanol-1	0,37	0,35	0,43	0,39 (— 9 %)	0,40 (— 7 %)
Hexanol	0,60	0,62	0,54	0,63 (+ 17 %)	0,58 (+ 7 %)
Phényl-2-éthanol	30,34	37,92 (+ 25 %)	29,28	39,89 (+ 36 %)	31,60 (+ 8 %)
Propanol	28,0	26,0	29,0	29,0	27,0
Méthyl-2-propanol-1	52,0	49,0	51,0	51,0	50,0
Méthyl-2 + Méthyl-3, butanol-1	107,0	99,0	119,0	106,0	112,0
Acétaldéhyde	78,89	78,48	76,19	68,89 (— 10 %)	70,20 (— 8 %)
γ-butyrolactone	13,58	15,13 (+ 11 %)	15,03	18,34 (+ 22 %)	13,36 (— 11 %)

TABLEAU IX

Évolution du poids sec des levures, des protéines intracellulaires et de leur pourcentage par rapport au poids sec pendant la conservation des vins mousseux sur levures.

	ESSAIS B_1 et B_2						Essais C_1 et C_2					
	Poids sec des levures (mg/l)		Protéines intracellulaires (mg/poids sec par litre)		Protéines (% par rapport au poids sec)		Poids sec des levures (mg/l)		Protéines intracellulaires (mg/poids sec par litre)		Protéines (% par rapport au poids sec)	
	bouteille	cuve close	bouteille	cuve close	bouteille	cuve close	bouteille	cuve close	bouteille	cuve close	bouteille	cuve close
Fin de prise de mousse	115	181	17,4	47,5	15	26	122	115	33,0	47,8	27	42
200 jours après la fin de la prise de mousse	113	178	17,1	42,2	15	24	115	110	29,4 (– 11 %)	40,9 (– 14 %)	26	37
300 jours après la fin de la prise de mousse	110	–	16,9	–	15	–	124	109	29,4 (– 11 %)	17,0 (– 64 %)	24	16
500 jours après la fin de la prise de mousse	105 (– 9 %)	–	12,3 (– 29 %)	–	12	–	125	110	20,0 (– 40 %)	14,0 (– 71 %)	16	13
750 jours après la fin de la prise de mousse	–	–	–	–	–	–	118 (– 3 %)	103 (– 10 %)	13,3 (– 60 %)	10,0 (– 78 %)	11	10

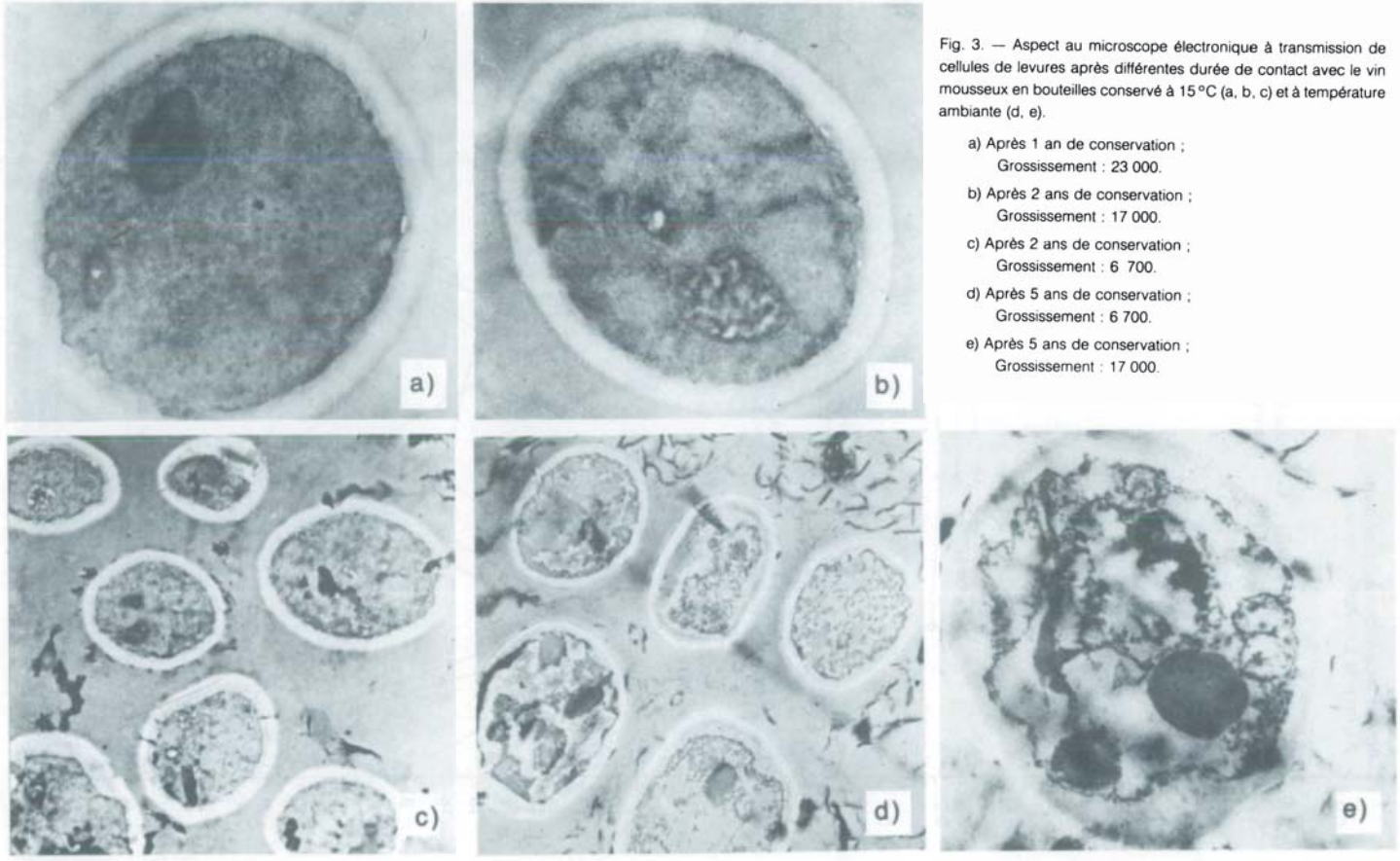


Fig. 3. — Aspect au microscope électronique à transmission de cellules de levures après différentes durée de contact avec le vin mousseux en bouteilles conservé à 15 °C (a, b, c) et à température ambiante (d, e).

a) Après 1 an de conservation ;
Grossissement : 23 000.

b) Après 2 ans de conservation ;
Grossissement : 17 000.

c) Après 2 ans de conservation ;
Grossissement : 6 700.

d) Après 5 ans de conservation ;
Grossissement : 6 700.

e) Après 5 ans de conservation ;
Grossissement : 17 000.

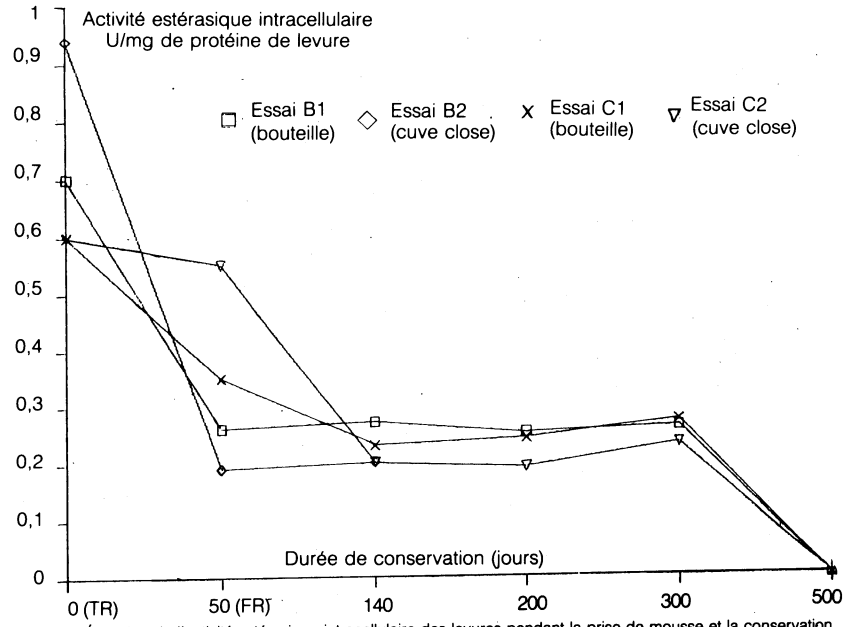


Fig. 4. — Évolution de l'activité estérasique intracellulaire des levures pendant la prise de mousse et la conservation.
L'activité spécifique (U/mg) est exprimée en µmoles de p-nitrophénol libéré en 30 minutes par mg de protéine de levure.

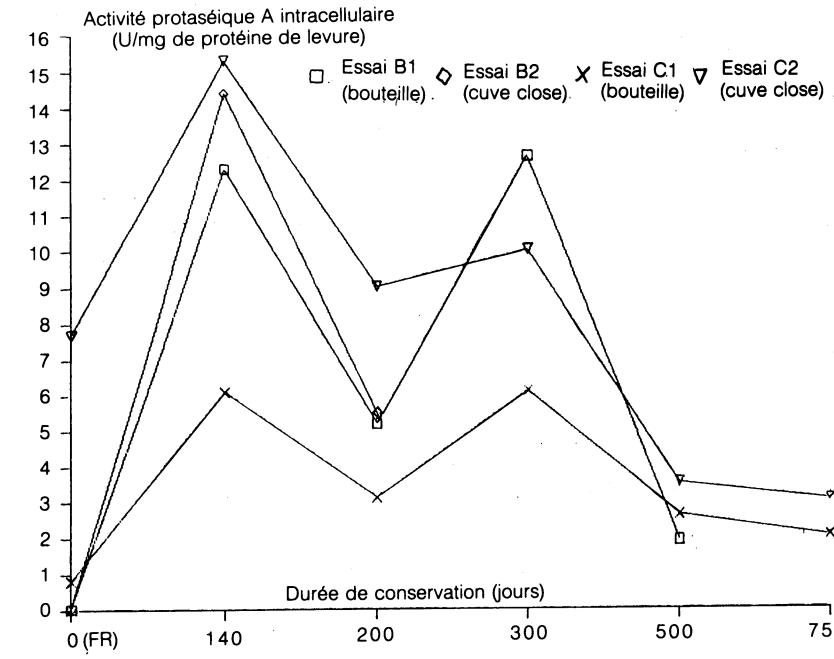


Fig. 5. — Évolution de l'activité protéasique A intracellulaire des levures
à partir de la fin de la prise de mousse jusqu'à 25 mois de conservation.
L'activité spécifique (U/mg) est exprimée en µmoles de tyrosine libérée en 3 heures par mg de protéine de levure.

II.— ÉVOLUTION DES LEVURES AU COURS DE L'ÉLABORATION DES VINS MOUSSEUX

L'évolution de la population levurienne pendant la prise de mousse suit les phases caractéristiques de la fermentation alcoolique. Pendant toute la période de conservation, le nombre total de cellules est pratiquement constant alors que celles-ci perdent leur aptitude à se reproduire deux à trois mois après la fin de la prise de mousse.

L'examen, en microscopie électronique à transmission, des levures étant restées un à deux ans en contact avec le vin mousseux montre que leur paroi et leur membrane cellulaire n'ont pas subi de modifications importantes (figure 3a, 3b et 3c). Après deux ans de contact, quelques cellules présentent un début de détachement de la membrane cytoplasmique (figure 3c). Après cinq ans de contact à température ambiante, on constate de nombreux cas où cette membrane s'est tout à fait détachée et où le cytoplasme s'est contracté (figure 3d et 3e).

Le poids sec du dépôt levurien (tableau IX, essais B1, C1, C2) ne varie pratiquement pas pendant toute la conservation mais diminue légèrement entre 17 et 25 mois. Il représente 22 p. 100 environ du poids frais.

Les protéines intracellulaires diminuent, soit à partir de 10 mois de conservation (essais B1, C1), soit de façon continue (essai C2) allant en s'accélérant après 10 mois. De même, l'activité estérasique diminue à partir du tirage, plus ou moins vite selon les essais (figure 4), en restant dosable jusqu'à 10 mois après la fin de prise de mousse.

L'activité protéolytique intracellulaire A varie de façon complexe, en général elle passe par un maximum 5 mois et 10 mois après la fin de la prise de mousse (figure 5), puis elle diminue constamment jusqu'au 25e mois de la conservation mais en restant toujours dosable.

L'évolution de l'activité protéasique, à partir de la fin de la prise de mousse jusqu'au 5e mois, alors que les protéines cytoplasmiques demeurent constantes, peut s'expliquer par une réorganisation intracellulaire liée à la modification du substrat, c'est-à-dire à la disparition du sucre. Au cours de cette période, les levures perdent progressivement leur capacité de reproduction. La nouvelle augmentation entre 7 et 10 mois, concomitante du début de la diminution des protéines cytoplasmiques sans variation du poids de cellules, peut s'expliquer par une dégradation des protéines intracellulaires et une formation de composés azotés à bas poids moléculaire. Toutefois, cette hypothèse ne peut être que partielle étant donné que nous n'avons dosé que l'activité protéasique A. Au sein de la cellule, d'autres protéases vacuolaires sont présentes (protéase B, carboxypeptidase, aminopeptidase) en même temps que certains régulateurs de l'activité enzymatique (WOLF et *al.*, 1979; WOLF et HOLZER, 1980; JONES, 1984; MOLNAR et *al.*, 1980).

La numération des protoplastes sur levures isolées après deux ans de contact avec le vin mousseux montre la présence de protoplastes dans 80 p. 100 de cellules. Après cinq ans de contact à température ambiante, le nombre de ceux-ci diminue de moitié.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, on a montré que les conditions de la prise de mousse exercent une influence sur l'évolution des composants azotés et aromatiques pendant la transformation du vin de base en vin mousseux.

En ce qui concerne les substances azotées, au cours du vieillissement et à partir de 7 à 8 mois après la prise de mousse, les levures libèrent une petite quantité d'azote sous forme d'aminoacides et d'oligopeptides. Ce phénomène que confirme nos travaux précédents (COLAGRANDE et SILVA, 1981 ; COLAGRANDE et *al.,* 1984), est en relation avec la diminution des protéines intracellulaires ainsi qu'avec l'augmentation de l'activité protéasique A. Elle pourrait être favorisée par une modification de la composition de la paroi cellulaire (WOLF et *al.,* 1979 ; NOMBELA et SANTA MARIA 1984 ; CHARPENTIER et *al.,* 1986). A cet égard, l'augmentation des teneurs en asparagine, générale dans tous les essais, est en accord avec cette hypothèse étant donné que cet aminoacide assure la liaison entre protéines et mannanes de la paroi cellulaire (CABIB et *al.,* 1982 . FLET, 1984). La petite quantité d'azote cédée pourrait justifier la très légère diminution du poids des levures.

On observe également que, dans le temps, les levures conservent une activité protéasique A et que leurs protéines intracellulaires se dégradent tandis que les parois et les membranes cellulaires ne sont que peu modifiées. Après cinq ans, la modification de la structure cellulaire caractérisée par le détachement de la membrane cytoplasmique, rare jusque là, devient importante.

En ce qui concerne les composés aromatiques dosés (esters, acides, alcools) on ne peut établir de relation entre leur évolution et l'activité lévurienne. Etant donné, toutefois que 10 mois après la prise de mousse, on a encore une activité estérasique intracellulaire et que les teneurs en certains composés aromatiques sont modifiées de façon différentes par la présence ou l'absence de levures, on peut penser que la présence de celle-ci accélère les réactions d'estérification et d'hydrolyse, même si ces réactions interviennent également — mais plus lentement — en leur absence.

Remerciements

Nous remercions le Dr F. FAORO (Faculté d'Agriculture, de l'Université de Milan) pour sa collaboration dans le domaine de l'analyse en microscopie électronique.

Ce travail a été réalisé avec l'aide du C.N.R. (Conseil National de la Recherche Scientifique, Contribution 82 00252 06,830062206,84 0105106.

Manuscrit reçu le 20 mars 1987 ; accepté pour publication le 21 mai 1987.

RÉSUMÉ

Dans ce travail on étudie l'influence de la maturation des vins mousseux en présence de levures, en particulier sur la composition des vins en aminoacides, protéines et composés aromatiques ainsi que sur celle en protéines et en activité estérasique et protéasique A intracellulaire des levures. Au cours du vieillissement du vin mousseux en présence de levures on a mis en

évidence une relation entre les variations en certains aminoacides et l'évolution dans les levures, de l'activité protéasique et des protéines cytoplasmiques. Au cours de la même période, la présence ou non des levures modifie de façon différente certains composés de l'arôme des vins. Toutefois, on n'a pas pu établir de relation entre l'évolution des composés aromatiques et l'activité enzymatique des levures.

SUMMARY

Trials of sparkling wine production in bottle and in pressure tank are prepared to appreciate the influence of the aging on the yeasts on aminoacid components, on aromatic compounds of sparkling wines, and on the activity of Protease A, on the esterasic activity and on intracellular proteins of the yeasts cells of the deposit.

The results show a relation between some aminoacids and the behaviour of the yeasts (constant presence and increase in the activity of Protease A, and decrease of intracellular proteins) during the aging on yeasts of sparkling wines.

We confirmed that the presence or the absence of yeasts modifies in a different quantity some aromatic compounds as volatile fatty acids, isoamylacetate an diethyl succinate.

This could be a consequence of the persistance of the intracellular esterasic activity that, in our experimentations, remains detectable until 300 days after the end of the secondary fermentation.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Einwirkung von Hefen beim Ausbau von Schaumweinen untersucht.

Bei dieser Studie legte man auf der einen Seite auf die Aminosäuren-, Eiweiß - und Aromenzusammensetzung des Weines Wert und auf der anderen Seite wurde der intrazellare Eiweiß-, Esterasen- und Proteasengehalt der Hefen analysiert. Zwischen den Aminosäurenschwankugen und der proteolytischen Aktivität und dem Zellplasmaeiweiß konnte während der Ausbauphase eine Relation herausgestellt werden.

Während der gleichen Phase bewirken die Präsenz oder die Abwensentheit der Hefen eine unterschiedliche Änderung bestimmter Aromen der Weine. Eine Relation zwischen Entwicklung der Aromastoffe und enzymatischer Aktivität der Hefen konnte jedoch nicht aufgestellt werden.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la influencia de la maduración de los vinos espumosas en presencia de levaduras, en particular la composición del vino en aminoácidos, proteínas y compuestos aromáticos, así como la composición en proteínas, las actividades esterásicas y proteásica de tipo A a nivel intracelular en las levaduras. A lo largo del envejecimiento del vino espumoso en presencia de las levaduras hemos puesto en evidencia una relación entre las variaciones de ciertos amino-ácidos y la evolución en las levaduras de la actividad proteasica y de las proteinas citoplasmáticas. A lo largo del mismo periódo, la presencia o no de las levaduras modifica de forma diferente ciertos compuestos aromáticos de los vinos. Sin embargo, no hemos podido establecer la relación entre la evolución de los compuestos aromáticos y la actividad enzimática de las levaduras.

RIASSUNTO

Sono state allestite prove di spumantizzazione in bottiglia e in autoclave per valutare l'influenza della maturazione in presenza di lieviti sui componenti amminoacidici, sui componenti dell'aroma dei vini spumanti e sull'attività proteasica A, sull'attività esterasica e sulle proteine intracellulari delle cellule di lievito del deposito.

I risultati mettono in evidenza una relazione tra le variazioni di alcuni amminoacidi e il comportamento dei lieviti (presenza costante e aumento dell'attività proteasica A e diminuzione delle proteine intracellulari) durante la fase di invecchiamento dei vini spumanti sui lieviti.

Dai nostri dati risulta inoltre che la presenza o l'assenza dei lieviti modifica in quantità differente alcuni componenti dell'aroma quali acidi grassi volatili, acetato di isoamile e dietilsuccinato. Ciò potrebbe essere una conseguenza della persistenza dell'attività esterasica intracellulare che, nelle nostre sperimentazioni, rimane determinabile fino ai 300 giorni dopo la fine della rifermentazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIER M., 1955. Enzymes of lipid metabolism, *Methods in Enzymology,* Academic Press, New-York, Tome 1, 627-642.

CABIB E., ROBERTS R. et BOWERS B., 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.,* **51,** 763-793.

CASOLI A. et COLAGRANDE O., 1981. Use of high-performance liquid chromatography for the determination of amino acids in sparkling wines. *Am. J. Enol. Vitic.,* **33,** N° 3, 135-139.

CHARPENTIER C., NGUYEN VAN LONG T., BONALY R. et FEUILLAT M., 1986. Alteration of cell walls structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol,* **24,** N° 5, 405-413.

CHENE. C.-H., JAMIESON A.M. et VAN GHELUW E., 1980. The release of fatty acids as a consequence of yeast autolysis. *Am. Soc. Brewing Chemists J.,* **38,** N° 1, 13-18.

COLAGRANDE O. et SILVA A. 1981. Considerazioni analitiche e tecnologiche sui diversi costituenti azotati dei vini spumanti. Simposio Internazionale Vini Spumanti, 10-11 giugno, Salice Terme (PV - Italie), Ed Chiriotti (Pinerolo - TO).

COLAGRANDE O. et SILVA A., 1981. Aspects qualitatifs et technologiques de l'application des méthodes thermiques dans la production des vins mousseux. *Connaissance Vigne Vin,* **15,** N° 3, 179-192.

COLAGRANDE O., SILVA A. et CASOLI A., 1984. Acides aminés dans les vins mousseux. *Connaissance Vigne Vin,* **18,** N° 1, 27-48.

DRAPEAU G.R., 1976. Protease from *Staphylococcus aureus. Methods in Enzymology,* Academie Press, New-York, Tome XLV, part B, 469-475.

FEUILLAT M. et CHARPENTIER C., 1982. Autolysis of yeasts in champagne. *Am. J. Enol. Vitic.,* **33,** N° 1, 6-13.

FEUILLAT M. 1985. Alcune caratteristiche del metodo classico di elaborazione degli spumanti. *L'Enotecnico,* **21,** N° 5, 475-484.

FLEET G.H., 1984. The occurence and function of endogenous wall degrading enzymes in yeasts. Symposium Proceedings "Microbial cell wall synthesis and autolysis", Madrid 3-6 july, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

HOUGH J.S. et MADDOX I.S., 1970. Yeast Autolysis. *Process Biochemistry, May,* 50-52.

JONES E.W., 1984. The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces* : genetic approaches, *Ann. Rev. Genetics,* **18,** 233-270.

KITAMURA K., KANEKO T. et YAMAMOTO Y., 1971. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter lutens. Arch. Biochem. Biophys.,* **145,** N° 1, 402-404.

KUO S.-C. et YAMAMOTO S., 1975. Preparation and growth of yeast protoplasts. *Methods in cell biology,* Academic Press, New York, Tome XI, 169-183.

LOYAUX D., ROGER S. et ADDA J., 1981. The evolution of Champagne volatiles during ageing. *J. Sci. Food. Agric.,* **32,** N° 12, 1254-1258.

MARGHERI G. VERSINI G., 1979. L'apporto delle tecniche analitiche moderne alla definizione ed al controllo della qualità dei vini. *Vini Ital.,* **21,** N° 119, 83-92.

MARGHERI G., VERSINI G. et GIANOTTI L., 1984. Vini spumanti di qualità metodo champenois. *Vini Ital.,* **26,** N° 1, 51-59.

MOLNAR I., OURA E. et SUOMALAINEN H., 1980. Determination of the autolysis of Champagne yeast by using 14C labelled yeast. *Acta Alimentaria,* **9,** N° 4,, 305-312.

MOLNAR I., OURA E., et SUOMALAINEN H., 1980. Changes in the activities of Champagne yeast during storage of sparkling wines. *Acta Alimentaria,* **9,** N° 4, 313-321.

MOLNAR I., OURA E. et SUOMALAINEN H., 1981. Study of volatile substance produced during the autolysis of Champagne yeast. *Acta Alimentaria,* **10,** N° 1, 27-36.

MONTEDORO G., 1986. Correlazione tra dati analitici, dati sensoriali e qualità dei vini spumanti. *Ind. Bevande,* **15,** N° 2, 97-103.

NOMBELA C. et SANTAMARIA C., 1984. Genetics of yeasts cell wall autolysis Symposium Proceedings «Microbial cell wall synthesis and autolysis». Madrid 3-6 july, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

PARKKINEN E., OURA E. et SUOMALAINEN H., 1978. The esterases of baker's yeast-I. Activity and localization in the yeast cell. *J. Inst. Brewing,* **84,** N° 1, 5-8.

RECUEIL des méthodes d'analyses des vins, 1972. Annexe A20, O.I.V. Paris..

SCHACTERLE G.R. et POLLACH R.L., 1973. A semplied method for the quantitative essay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.*, **51,** N° 2, 654-655.

SUOMALAINEN H. et LEHTONEN M., 1979. The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brewing.* **85,** N° 3, 149-156.

USSEGLIO-TOMASSET L., BOSIA P.D., DI STEFANO R. et CASTINO M., 1983. Oggettiva influenza del contatto con lieviti sulle caratteristische degli spumanti preparati con il metodo classico. *Vini Ital.,* **25,** N° 142, 3-9.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1985. Influenza delle metodologie di produzione sulle caratteristiche dei vini spumanti. *L'Enotecnico,* **21,** N° 5, 469-472.

WOLF D.H., EHMANN C. et BECK I., 1979. Genetic and Biochemical analysis of intracellular proteolysis in yeast. *30 Colloquium der Gessellschaft für Biologische chemie,* Mosbache (Baden) 26-28 april, Springer-Verlag. Berlin.

WOLF D.H. et HOLZER H., 1980. *Proteolysis in yeast. Microorganism and nitrogen sources,* John Willey & Sons Ltd. Chichester.