Connaissance Vigne Vin, 1985, **19**, N° 4, 229-240.

STIMULATION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE PAR L'ADDITION AU VIN D'ENVELOPPES CELLULAIRES DE LEVURE ET DIFFERENTS ADJUVANTS DE NATURE POLYSACCHARIDIQUE ET AZOTEE

Aline LONVAUD-FUNEL, Catherine DESENS et Annick JOYEUX

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

Des travaux récents (LONVAUD-FUNEL et *al.*, 1985) montrent que certains sous-produits du métabolisme des levures dans le moût de raisin sont en synergie avec l'alcool, inhibiteurs de la croissance des bactéries lactiques dans le vin ; ils rendent compte de l'incidence de la levure sur la fermentescibilité malolactique des vins (CARRE, 1982). Il s'agit essentiellement des acides décanoïque, dodécanoïque et palmitoléique.

Ces substances sont absorbées par certains matériaux, enveloppes cellulaires de levure (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1984), polysaccharides (LARUE et *al.*, 1985). En outre, les acides gras forment avec les protéines, des complexes qui masquent leur action inhibitrice (NIEMAN, 1954 ; KABARA, 1979).

Comme dans le cas de la levure, on a recherché un moyen d'activer la fermentation malolactique, non pas par un apport nutritionnel supplémentaire, mais plutôt par une levée de l'inhibition.

Compte-tenu de la toxicité des acides gras à l'égard des levures et des bactéries lactiques (acides décanoïque et dodécanoïque) on peut supposer que les matériaux qui activent la fermentation alcoolique, par piégeage des métabolites levuriens inhibiteurs, sont susceptibles de stimuler également la fermentation malolactique.

Dans ce travail, on a expérimenté l'action de diverses substances, enveloppes cellulaires ou écorces de levure, alginates, extrait de levure, dans des vins blancs et rouges de pH et de titre alcoométrique variables. On étudie leur incidence sur la croissance de *Leuconostoc œnos,* la cinétique de la fermentation malolactique et l'activité malolactique de biomasses non proliférantes.

MATERIELS ET METHODES

Tous les essais ont été réalisés avec une souche de *Leuconostoc œnos*, cultivée industriellement et fournie sous forme lyophilisée (Microlife Technics, Sarosota, Floride). Avant l'inoculation des échantillons, les bactéries sont réactivées pendant 24 ou 48 heures dans un milieu à base de jus de raisin (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1983).

Les différents adjuvants utilisés sont :

— enveloppes cellulaires de levure (Fould-Springer, Maison-Alfort),

— extrait de levure (Fould-Springer, Maison-Alfort),

— alginate (CECA S.A., Velizy),

— les polysaccharides de vin obtenus par précipitation à l'alcool (DUBOURDIEU,1978).

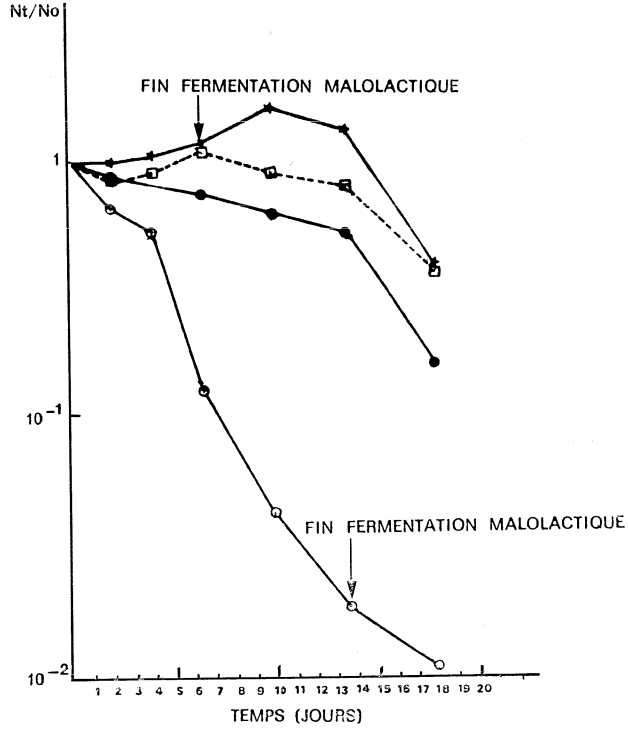


Fig. 1. Evolution de la population de *Leuconostoc œnos* au cours de la fermentation malolactique dans un vin additionné ou non d'écorces de levure.
Nt : nombre de bactéries par millilitres.
No : nombre de bactéries par millilitres à l'ensemencement.
○ : Témoin No = $3,7.10^7$.
◐ : + Ecorces No = $2,0.10^7$.
□ : + Ecorces lavées à l'alcool No = $4,0.10^7$.
★ : + Ecorces lavées à l'éther No = $3,0.10^7$.

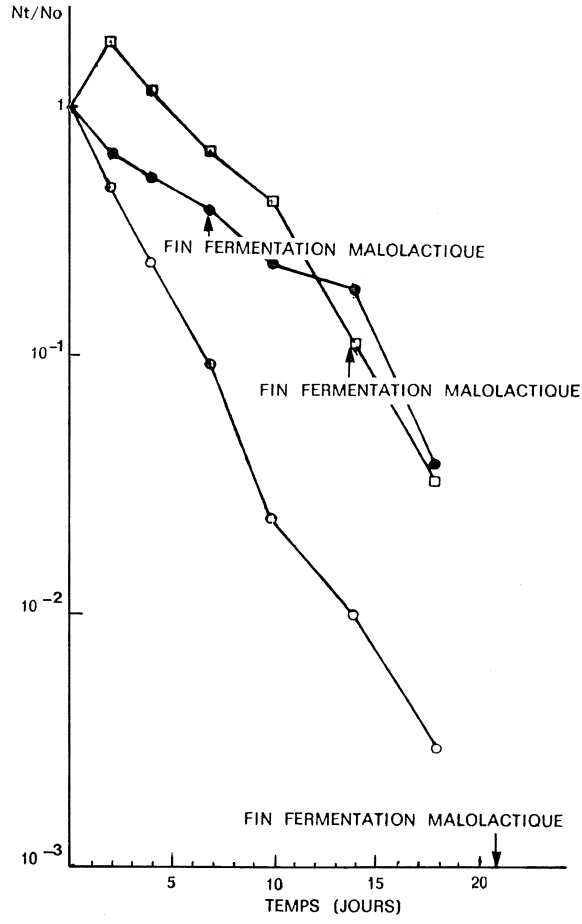


Fig. 2. Influence des extraits à l'alcool et à l'éther, d'écorces de levure sur la population de *Leuconostoc œnos* pendant la fermentation malolactique
Nt : nombre de bactéries par millilitres.
No : nombre de bactéries par millilitres à l'ensemencement.
○ : Témoin No = 6.10^7.
□ : + extrait à l'éther No = $1{,}8.10^7$.
● : + extrait à l'alcool No = $4{,}5.10^7$.

La fermentation malolactique est suivie, dans les échantillons ensemencés, d'une part en déterminant la population bactérienne par comptage de colonies développées sur milieu nutritif solide (LANARIDIS et LAFON-LAFOURCADE, 1983) ou par bioluminescence (LONVAUD-FUNEL et JOYEUX, 1982), et, d'autre part, en dosant l'acide malique par voie enzymatique (BOEHRINGER, Manheim).

Par ailleurs, on a mesuré la vitesse de décarboxylation de l'acide malique par des suspensions de bactéries non proliférantes, avec une électrode à CO_2 (LONVAUD et RIBÉREAU-GAYON, 1975). Cette détermination représente l'activité des bactéries à un moment donné ; elle n'est pas liée à la croissance de la population.

RESULTATS

I — INCIDENCE DES ENVELOPPES CELLULAIRES OU ÉCORCES DE LEVURE.

Un vin blanc (pH 3,4, éthanol 12 p. 100 vol., acide malique 7,5 g par litre) reçoit ou non 0,2 g par litre d'écorces de levure brutes ou lavées. Après 24 heures il est ensemencé avec une population de *Leuconostoc œnos* de l'ordre de 10^7 cellules par millilitre, puis incubé à 25°C.

Dans le vin témoin, on observe une diminution de la population jusqu'à $4{,}3.10^5$ cellules par millilitre après 18 jours. La dégradation de l'acide malique dure 15 jours (Figure 1). Dans le vin additionné d'écorces de levure, il n'y a pas de régression des populations viables. Elles se maintiennent au même niveau pendant deux jours avant que ne s'amorce une faible phase de prolifération. La multiplication cellulaire s'accentue après la dégradation complète de l'acide malique, dont la durée est raccourcie de huit jours par rapport au témoin.

TABLEAU I

Evolution de la population bactérienne au cours d'une culture en milieu semi-synthétique

Nombre de bactéries × 10^6 cellules par millilitre.

Temps	Essai n° 1		Essai n° 2	
(heure)	Témoin	+ écorces	Témoin	+ écorces
0	4	5	—	—
24	4	100	10	15
48	50	100	100	130
72	90	700	80	400
6 jours	—	—	50	700

Les écorces de levure, après lavage à l'alcool et à l'éther conservent une partie de leur efficacité. La solubilisation de constituants des écorces, actifs sur la fermentation malolactique, est confirmée par une autre expérience.

Les extraits, obtenus en évaporant sous vide les solutions de macération des écorces dans l'éthanol et l'éther, ont également une incidence favorable sur la survie des populations bactériennes (Figure 2) et stimulent la fermentation malolactique.

Lorsque des écorces de levure (0,2 g par litre) sont ajoutées non pas dans le vin, mais dans un milieu optimum de croissance (milieu de Carr), la population maximale est plus importante que dans le témoin (Tableau I).

Dans un autre essai, on fait varier dans un vin de base, le titre alcoométrique (10 et 12 p. 100 vol. éthanol), le pH (3,2 et 3,4) et la concentration en écorces de levure (0,1 ; 0,2 et 0,5 g par litre).

On ensemence avec 10^7 cellules par millilitres de *Leuconostoc œnos* réactivé. Dans toutes les conditions, la fermentation malolactique est activée en présence d'écorces (Figure 3). Sa durée est d'autant plus courte que la dose d'écorces est plus élevée, et que les conditions physico-chimiques sont plus favorables. Elle varie de dix jours à pH 3,4 et, 10 p. 100 vol. d'éthanol à plus de 45 jours à pH 3,2 et 12 p. 100 vol. d'éthanol, en présence de 0,5 g d'écorces de levure par litre. Dans les mêmes conditions elle est, dans les témoins respectifs, de 18 et 55 jours et reste dans ce dernier cas très incomplète.

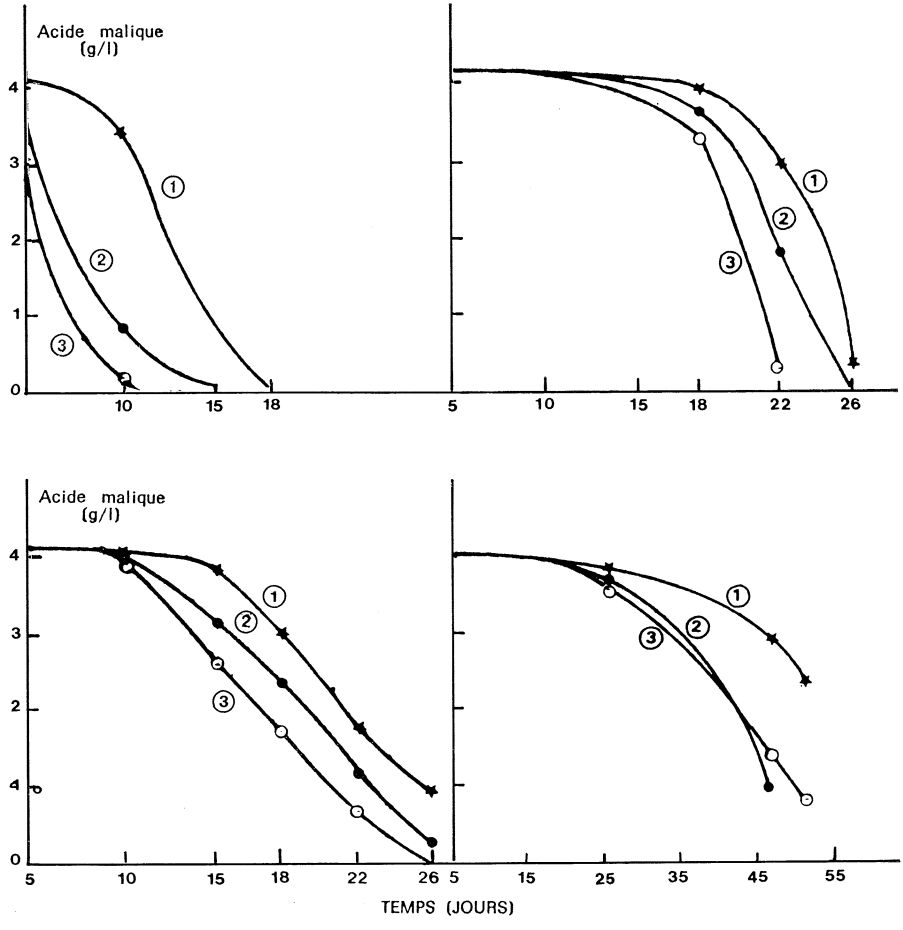


Fig. 3. Evolution de la fermentation malolactique en fonction des conditions physicochimiques et de la présence éventuelle d'écorces de levures
1 Témoin 2 + écorces 0,1 g par litre 3 + écorces 0,5 g par litre

Dans un vin rouge supplémenté en acide décanoïque (4 mg par litre), l'addition d'écorces (0,2 g par litre) suivie d'une filtration après 24 heures de contact, redonne au vin sa fermentescibilité malolactique première (Tableau II).

De même dans un vin blanc, ensemencé par *Leuconostoc œnos,* on note une inhibition provoquée par l'acide dodécanoïque (0,5 mg par litre) ; mais l'addition d'écorces de levure permet d'augmenter la fermentescibilité du vin (Tableau III).

II — INCIDENCES D'AUTRES ADJUVANTS POLYSACCHARIDIQUES ET PROTEIQUES.

Dans un milieu synthétique additionné de quantités connues d'acides hexanoïque, octanoïque, décanoïque et de leurs esters éthyliques, l'alginate

TABLEAU II

Influence de l'acide décanoïque et de l'addition d'écorces de levures sur la fermentation malolactique d'un vin rouge
(Acide malique initial 3 g par litre ; pH 3,45)

Les teneurs en acide malique sont exprimées en g par litre.

Durée (jours)	Témoin	+ C 10	+ C 10 + écorces
2	2,53	2,77	2,45
5	1,88	2,65	1,77
8	1,42	2,47	1,46

TABLEAU III

Influence de l'addition de l'acide dodécanoïque et des écorces de levure sur la fermentation malolactique d'un vin blanc
(Acide malique initial 6,4 g par litre ; éthanol 12 p. 100 ; pH 3,4)

Les teneurs en acide malique sont exprimées en g par litre.

Durée (jours)	Témoin	+ C 12	+ écorces	+ C 12 + écorces
3	2,82	3,76	2,24	2,88
4	2,14	2,90	2,14	2,00
5	0,91	1,82	0,73	0,75
6	0,32	1,32	0,24	0,23

(Réf. 550, CECA), après 24 heures de contact, élimine un fort pourcentage de ces substances et en particulier l'acide décanoïque et son ester éthylique (Tableau IV).

Ajouté à un vin blanc (éthanol 10 p. 100 vol., pH 3,45, acide malique initial 4 g par litre) à la dose de 0,5 g par litre, il permet une dégradation un peu plus rapide de l'acide malique (Tableau V).

D'autre part, on recueille les polysaccharides extraits de 300 ml d'un vin blanc, issu de raisins sains, par précipitation à l'alcool. Ils sont ajoutés à 60 ml d'un vin blanc (éthanol 12 p. 100 vol. ; pH 3,4, acide malique initial 4,5 g par litre). L'efficacité éventuelle de cet adjuvant a été comparée à celle d'une addition d'autolysat de levure, activateur connu de la fermentation malolactique. Un même volume de ce vin reçoit ou non 100 mg par litre d'extrait de levure (Fould-Springer). Les trois échantillons sont ensemencés avec 10^7 cellules par millilitres de *Leuconostoc œnos* réactivé et mis à incuber. Pendant les six premiers jours, la dégradation malolactique est lente et identique dans les trois échantillons (Figure 4).

TABLEAU IV

Effet de l'addition d'alginate (0,2 g par litre) sur la teneur en acides gras et esters d'un milieu synthétique

(Milieu : 12 p. 100 vol. éthanol ; pH 3,5)

	Teneurs initiales (mg/l)	Variations (%)
C6 C2	0,73	— 32
C8 C2	0,60	— 4
C10 C2	0,31	— 51
C6	7,23	— 8
C8	10,15	— 24
C10	3,66	— 39

Par la suite elle devient plus rapide en présence d'adjuvants. Au douzième jour, la teneur des vins en acide malique résiduel est de 2,0, 0,75 et 0,5 g par litre respectivement dans le témoin et les vins additionnés d'extrait de levure et de polysaccharides.

Dans un autre essai, le vin (éthanol 12 p. 100 vol., pH 3,5, acide malique initial 5,5 g par litre) est supplémenté ou non en acide palmitoléique dont on connait l'action antibactérienne (LONVAUD-FUNEL et *al.*, 1985) à une dose courante dans les vins 0,6 mg par litre (TORRES ALEGRE, 1982). Les échantillons reçoivent ensuite 100 mg d'extrait de levure par litre. On

TABLEAU V

Influence de l'addition d'alginate sur la vitesse de la fermentation malolactique

(Acide malique initial : 4 g par litre ; ensemencement du vin : 4.10^7 cellules par millilitre)

Les teneurs en acide malique sont exprimées en g par litre.

Durée (jours)	Témoin	+ Alginate
3	2,82	2,98
4	2,14	1,80
5	0,91	0,59
6	0,32	0,16

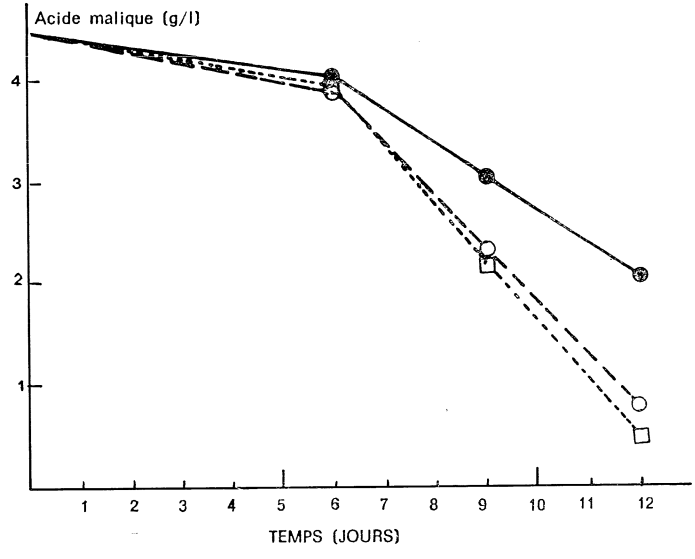


Fig. 4. Influence de l'addition d'extrait de levure et de polysaccharides de vin sur la vitesse de la fermentation malolactique.
● Témoin - ○ + extrait de levure - □ + polysaccharides

mesure dans ces divers milieux l'activité malolactique d'une population bactérienne non proliférante à l'aide de l'électrode à CO_2. L'acide palmitoléique inhibe fortement l'activité de *Leuconostoc œnos* (Figure 5). L'inhibition est levée en partie par l'extrait de levure. Néanmoins l'activité malolactique demeure nettement diminuée par rapport à celle observée dans le vin témoin et le vin additionné des deux extraits.

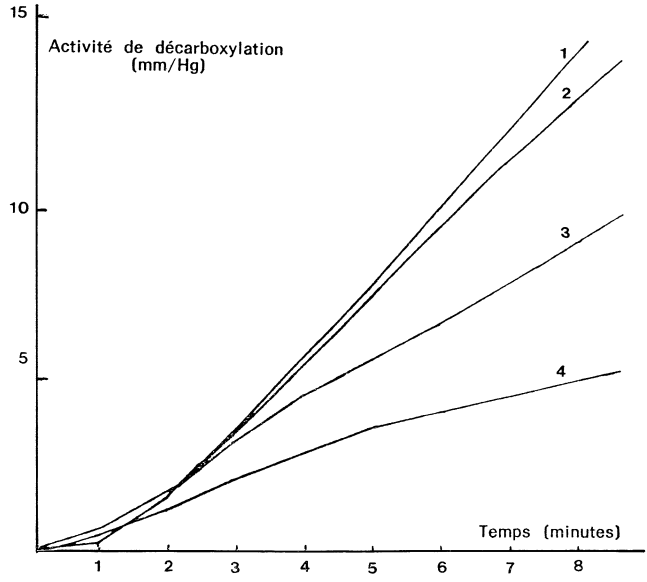


Fig. 5. Influence de l'extrait de levure sur l'inhibition de l'activité malolactique par l'acide palmitoleique.
1 vin + extrait de levure - 2 vin - 3 vin + extrait de levure + C16:1 - 4 vin + C16:1

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats mettent en évidence les points suivants :

1°. Il est possible de stimuler la fermentation malolactique par des matériaux capables d'enlever au vin certains acides gras et métabolites levuriens toxiques pour les bactéries lactiques. Parmi ceux qui ont été expérimentés, les écorces de levure (0,2 g par litre) sont les plus performantes. Néanmoins les facteurs inhibiteurs de la fermentation malolactique sont nombreux et leurs effets défavorables s'ajoutent. On comprend que l'efficacité des écorces soit d'autant plus grande que l'action inhibitrice exercée par le pH et l'éthanol est moindre.

2°. Les écorces de levures agissent en favorisant la croissance et le maintien en survie prolongée des populations de *Leuconostoc œnos* ; en conséquence, elles stimulent la fermentation malolactique.

3°. L'action des écorces est essentiellement liée à la propriété absorbante de la fraction polysaccharidique (LARUE et *al.*, 1985). Cependant, leur traitement par macération dans l'alcool ou l'éther diminue un peu leur efficacité et les extraits obtenus sont activateurs des bactéries. Le mécanisme d'action est donc plus complexe que celui mis en jeu pour l'activation de la fermentation alcoolique.

4°. Les alginates, mais aussi les polysaccharides du vin, agissent de la même manière, par absorption, mais sont moins actifs.

5°. Un autolysat de levure ajouté dans un milieu contenant un acide gras toxique augmente l'activité malolactique d'une biomasse bactérienne non proliférante. Cette action instantanée, sans relation avec la croissance bactérienne, semble indiquer qu'ils interviennent comme les écorces et les autres polysaccharides en atténuant l'action inhibitrice de certains métabolites toxiques. Jusqu'à maintenant les autolysats étaient considérés exclusivement comme des nutriments azotés et vitaminiques (GUILLOUX-BENATIER et *al.*, 1985) ; nos résultats laissent supposer qu'ils pourraient agir en éliminant des métabolites toxiques en formant des complexes entre les protéines constitutives et les acides gras du milieu.

RESUME

L'addition au vin d'écorces de levure (0,2 g par litre) permet une stimulation de la fermentation malolactique. Leur action s'exerce en augmentant la population bactérienne et surtout en retardant et atténuant la phase de déclin. Le traitement du vin par des polysaccharides (alginates, polysaccharides extraits de vin) ou par l'extrait de levure accélère aussi le processus de dégradation de l'acide malique. Ces adjuvants agissent probablement en limitant l'action inhibitrice de certains métabolites levuriens tels les acides gras.

SUMMARY

Addition of yeast ghosts to wine (0,2 g per liter) stimulates the malolactic fermentation. The bacterial population is increased furthermore the declin phase is delayed. Addition of polysaccharides to wine (alginate, polysaccharides extracted from wine) or yeast extract also accelerate the malic acid degradation. These additions probably limit the inhibition by some products of the yeast metabolism like fatty acids.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Hinzufuegen der Hefeschale in den Wein erlaubt eine Anregung der malolaktischen Gaerung. Ihre Bedeutung liegt in der Erhoehung der Bakterien-population und vor allem im Verlangsamen und Mildern der Endphase. Die Behandlung des Weines mit Polysacchaiden (Alginaten, polysacchaide Auszuege des Weines) oder mit Hefeextrakten beschleunigt ebenfalls den Abbauprozess der malischen Saeure.

Diese Zusatzmittel reagieren vermutlich insofern, dass sie die inhibitorreaktion (Hemmung) bestimmter Hefestoffwechselfaktoren wie 2.B. der Fettsaeuren beschraenken.

RESUMEN

Una adición de cortezas de levaduras, a razón de 0,2 gramo por litro en los mostos, estimula la fermentación maloláctica.

Se observa entonces un incremento de la cantitad de lactobacterias, acompañado por un retraso y menor efecto de la fase mortal de dichas bacterias.

Un tratamiento previo de los vinos por polisacaridas extraídos del vino, o alginatos, o extractos de levaduras, favorece el metabolismo maloláctico. Quinzás

estas sustancias añadidas limiten los efectos represivos de productos de la fermentación alcohólica como los ácidos grasos.

RIASSUNTO

L'addizione di scorze di lievito nel vino (0,2 g per litro) permette una stimolazione della fermentazione malolattica. La loro azione si esercita aumentando la popolazione batterica e sopratutto rallentando e attenuando la fase di declino. Il trattamento del vino con polisaccaridi (alginati, polisaccaridi estratti dal vino) o con l'estratto di lievito, accelera anche il processo di degradazione dell'acido malico. Questi adiuvanti si comportano probabilmente limitando l'azione inibitoria di certi metaboliti dei lieviti come gli acidi grassi.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CARRE E., 1982. Recherches sur la croissance des bactéries lactiques en vinification. Désacidification biologique des vins. *Thèse Doctorat 3e cycle,* Université de Bordeaux II.

DUBOURDIEU D., 1978. Etude des polysaccharides secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Incidence sur les difficultés de clarification des vins de vendanges pourries. *Thèse Docteur-Ingénieur* en Œnologie-Ampélologie, Université de Bordeaux II.

FEUILLAT M., BIDAN P. et ROSIER Y., 1977. Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés des vins. *Ann. Technol. Agric.,* **26**, 435-447.

GUILLOUX-BENATIER M., FEUILLAT M. et CIOLFI B., 1985. Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin : Effet stimulant des autolysats de levures. *Vitis,* **24**, 59-74.

KABARA J.J., 1979. Toxicological bactericidal and fungicidal properties of fatty acids and some derivatives. *J. Am. Chem. Soc,* **56**, 760A-767A.

LAFON-LAFOURCADE S., LONVAUD-FUNEL A. et CARRE E., 1983. Lactic acid bacteria of wines: stimulation of growth and malolactic fermentation. *Antonie Van Leeuwenhock,* **49** (3), 349-352.

LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environm. Microbiol.,* **47** (6), 1246-1249.

LANARIDIS P. et LAFON-LAFOURCADE S., 1983. Contrôle microbiologique des vins. Influence de la composition du milieu nutritif solide sur le dénombrement des bactéries lactiques du vin. *Bull. OIV,* **628**, 433-437.

LARUE F., GENEIX C., PARK M., MURAKAMI Y., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1985. Incidence de certains polysaccharides insolubles sur la fermentation alcoolique. *Connaissance Vigne Vin,* **19**, n° 1, 41-52.

LONVAUD M. et RIBÉREAU-GAYON P., 1975. Determination of the activity of the malolactic enzyme of lactic acid bacteria using a carbon dioxide electrode. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food.* J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting editors. Academic Press, London, 55-68.

LONVAUD-FUNEL A. et JOYEUX A., 1982. Application de la bioluminescence au dénombrement des microorganismes vivants dans les vins. *Connaissance Vigne Vin,* **16**, n° 4, 241-256.

LONVAUD-FUNEL A., JOYEUX A., DESENS C. and RIBÉREAU-GAYON P. The inhibition of malolactic fermentation of wines by fatty acids formed during alcoholic fermentation. (Soumis pour publication *Appl. Environ. Microbiol.*).

NIEMAN C., 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.,* **18**, 147-163.

TORRES ALEGRE V., 1982. Formation des acides gras et autres produits secondaires au cours de la vinification. Interprétation statistique des résultats. *Thèse Docteur-Ingénieur,* Université de Bordeaux II.