Connaissance Vigne Vin, 1979, **13**, N° 1, 51-76.

QUELQUES OBSERVATIONS SUR LES PROBLEMES MICROBIOLOGIQUES DE LA VINIFICATION EN BLANC

Suzanne LAFON-LAFOURCADE et P. RIBÉREAU-GAYON

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

INTRODUCTION

La fermentation alcoolique est le plus anciennement connu et le plus exploré des processus biochimiques. La fermentation du moût de raisin a fait l'objet de nombreux travaux (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1976). Dans le cas des vendanges rouges, les problèmes fermentaires ont constitué, au début du siècle, un grave problème technique à l'origine de nombreux accidents ; ils ont trouvé une solution dans les années 50, par la maîtrise des températures et par la diffusion des remontages avec aération. Cependant, bien des difficultés subsistent encore en vinification en blanc : départs en fermentation tardifs, fermentations « languissantes », arrêts de fermentation avant l'épuisement complet du sucre ou avant que ne soit atteint l'équilibre sucre sur alcool convenable.

Pour bien appréhender l'explication de ces phénomènes, il est nécessaire de considérer la fermentation sous son aspect biologique. La fermentation alcoolique n'est pas seulement un bilan analytique sur lequel figure, en équivalence à un poids de sucre dégradé, une somme de produits principaux et secondaires. Elle est essentiellement la conséquence de l'ensemble des activités biochimiques par lesquelles la levure assure son édification, sa multiplication, son entretien, c'est-à-dire l'ensemble de ses fonctions vitales. Or les contraintes de la vinification, « naturelles » ou technologiques, imposent aux levures des conditions de vie particulières qui peuvent devenir défavorables à l'une ou à l'autre de ces fonctions ; on observe alors des « difficultés de fermentation ».

D'un autre côté, on a, jusqu'à maintenant, étroitement associé fermentation et croissance des levures ; il était implicitement admis que, pour une levure déterminée, la quantité de sucre fermentée dépend de la densité des populations. Il est sans conteste que la multiplication des levures constitue le support fondamental de la fermentation, mais nos travaux récents ont montré qu'il n'est pas le seul ; en vinification, une partie de la dégradation du sucre repose sur l'activité de populations non proliférantes ; un ralentissement ou un arrêt de la fermentation peuvent avoir

d'autres origines qu'un défaut de croissance. Soulignons cependant que ces problèmes sont spécifiques de la fermentation du moût de raisin parce que ce milieu est particulièrement riche en sucre ; ils se rencontrent surtout en Bordelais qui produit de grands vins liquoreux (Sauternes, Barsac), issus de moûts enrichis en sucre et appauvris en éléments nutritifs par la « pourriture noble » ; cette question présente une grande complexité et il existe peu de travaux fondamentaux permettant d'en donner une interprétation théorique.

Nous proposons ici une analyse des caractères microbiologiques de la vinification en blanc et des causes des difficultés de fermentation des moûts de raisins ; nous étudions ensuite les moyens actuellement connus pour y remédier, leur efficacité et leurs limites ; nous indiquons enfin l'orientation des recherches en cours, les résultats déjà obtenus et ceux que l'on peut espérer.

Les observations nouvelles décrites dans cette publication résultent des travaux récents effectués à l'Institut d'Œnologie et auxquels ont participé M. S. CHAUVET, Mme A. JOYEUX, Mlle F. LARUE et Mlle V. LUCMARET.

LES PARTICULARITES MICROBIOLOGIQUES DE LA VINIFICATION EN BLANC

I. — LES CONTRAINTES DE LA VINIFICATION EN BLANC

Contrairement à l'élaboration d'autres boissons fermentées, en vinification, microflore, milieu et conditions de la fermentation sont imposés pour l'essentiel par la nature et par les pratiques œnologiques.

a) La microflore

L'élaboration du vin implique une fermentation « spontanée », c'est-à-dire induite par la microflore (levures, moisissures, bactéries) se trouvant naturellement à la surface du raisin et du matériel vinaire. Ces populations, varient en densité et en nature selon les conditions climatiques, l'état sanitaire de la vendange et l'état hygiénique du chai. Sur le raisin, elles sont constituées en majeure partie de microorganismes à métabolisme oxydatif (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1976). En conséquence, les moûts des premières journées de vendange « fermentent mal » par suite d'une population de levures fermentaires trop faible, bien que les levures totales soient relativement abondantes, mais il s'agit essentiellement de levures impropres à la fermentation.

Après quelques jours de fonctionnement du chai de vinification, une sélection naturelle intervient ; les *Saccharomyces* deviennent largement prépondérantes ; dès lors les fermentations se déroulent rapidement. Des populations de l'ordre de 10^6 cellules par ml sont fréquentes dans le moût dès son logement en récipient de fermentation (cuves ou barriques) (AMERINE, 1973 ; GALZY, 1973) : il s'agit alors de levures fermentaires, dévelop-

pées dans de larges conditions d'aérobiose ce qui leur confère, comme nous le verrons plus loin, une forte activité métabolique (LARUE, 1978).

b) **Le milieu**

Le moût de raisin présente une constitution différente selon le cépage, le sol, les conditions climatiques de l'année. Sa composition se trouve aussi fortement conditionnée par les modalités technologiques, variables en fonction du type de vin recherché. La vinification en blanc sec exige un débourbage préalable des moûts qui élimine les particules végétales susceptibles de communiquer de mauvais goûts mais qui aussi favorisent le déroulement de la fermentation (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975). La vinification des grands vins liquoreux nécessite une surmaturation de la vendange et le développement sur le raisin de *Botrytis cinerea* sous la forme de « pourriture noble » ; la conséquence est un accroissement des difficultés de fermentation par épuisement du milieu en éléments nutritifs et par apport de substances inhibitrices du développement des levures. Une caractéristique est la concentration en sucre du moût élevée ; on attend de la fermentation alcoolique, soit la dégradation totale d'environ 220 g par l de sucre en vinification en blanc sec, soit la dégradation de près de 75 p. 100 des 350 g par l de sucre initiaux, et parfois davantage, en vinification en liquoreux.

c) **Les conditions de la fermentation**

En vinification en blanc, on préconise des températures de fermentation relativement basses (de 16 à 21 °C) qui favorisent la formation des esters participant à l'arôme des vins. En outre, le moût, saturé d'air au cours des manipulations au chai, se trouve rapidement privé d'oxygène dès son logement en grand volume. Ces conditions peuvent être des éléments défavorables du déroulement de la fermentation.

II. — LE CYCLE DE CROISSANCE DES LEVURES ET LA CINETIQUE DE LA FERMENTATION EN VINIFICATION

L'ensemble des contraintes propres à la vinification impose aux levures un cycle de croissance particulier qui commande la cinétique de la fermentation.

Ce cycle présente les trois phases classiques des cycles microbiens (KUNKEE et AMERINE, 1970 : LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1976) : phase de multiplication, phase stationnaire, phase de déclin. Néanmoins il s'en distingue par plusieurs points (fig. 1) : *a)* une durée relativement longue (de 8 à 40 jours, selon la concentration en sucre du moût) dans lequel la phase de multiplication est relativement courte (2 à 5 jours) ; *b)* à partir d'un inoculum naturel important (10^5 à 10^6 cellules par ml), la croissance totale demeure modérée (10^6 à 10^8 cellules par ml environ) ; *c)* l'arrêt de la croissance est provoqué par des facteurs autres que l'épuisement du milieu en nutriments et en particulier en substrat énergétique (sucre) (LAFON-LAFOURCADE et RIBÉREAU-GAYON, 1976).

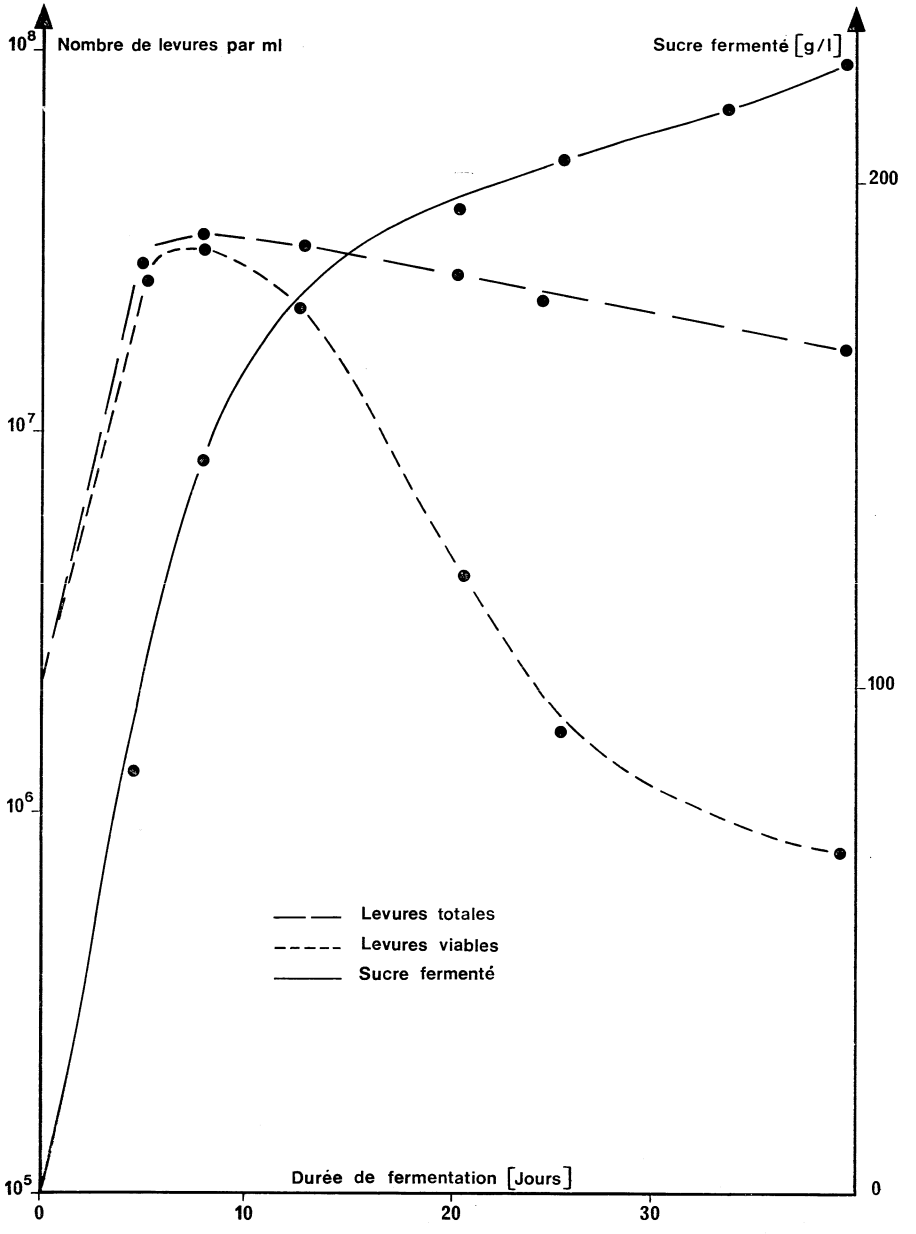


Fig. 1. — Cycle de croissance des levures et cinétique de la fermentation dans un moût riche en sucre (320 g/l).

La cinétique de la fermentation est directement liée au cycle de croissance. Un cas exemplaire est fourni par la fermentation spontanée d'un moût de raisin provenant de vendange parasitée par *Botrytis cinerea*, titrant 320 g par l de sucre (fig. 1). La vitesse fermentaire se maintient constante et maximale jusqu'au 11e jour où commence la phase de déclin des populations levuriennes. A ce moment la population viable reste encore abondante, mais elle perd brusquement une grande partie de son activité métabolique ; la vitesse journalière moyenne de dégradation du sucre passe de 15,4 g par l pendant les onze premiers jours à 5 g par l pendant les trois jours suivants ; au quatorzième jour le moût contient encore environ 150 g par l de sucre. Au cours de la phase de déclin, qui voit les populations levuriennes décroître rapidement, la fermentation continue mais à vitesse ralentie ; il faut 24 jours pour dégrader 35 g par l de sucre supplémentaire. La fermentation s'arrête au 40e jour en laissant 100 g par l de sucre non transformé.

En conséquence, pour que la fermentation se déroule dans les meilleurs délais, il faut que le sucre soit dégradé pendant la phase de multiplication des levures et la phase dite « stationnaire » ; la presque totalité de la population levurienne demeure viable et très active ; cette condition est généralement réalisée sans difficulté lorsque la concentration en sucre n'excède pas 200 g par l. Par contre pour des teneurs en sucre supérieures, la fermentation doit se prolonger pendant la phase de déclin de la population levurienne ; elle devient de plus en plus lente, soit avec des risques accrus d'arrêt de fermentation avant l'épuisement total du sucre (secs), soit avant que ne soit atteint l'équilibre sucre sur alcool souhaité (liquoreux) (LAFON-LAFOURCADE et RIBÉREAU-GAYON, 1976).

ANALYSE DES DIFFICULTES DE FERMENTATION

La fermentescibilité d'un moût peut se définir par la quantité de sucre transformée dans des conditions déterminées. Une perte de fermentescibilité a pour conséquence des fermentations lentes et des arrêts de fermentation prématurés ; les causes sont différentes selon qu'il s'agit des moûts de raisin destinés à l'élaboration de vins secs ou de vins liquoreux, mais des mécanismes semblables interviennent au niveau cellulaire, dans un cas comme dans l'autre, pour expliquer la diminution de la fermentescibilité.

I. — CAS DES VINS BLANCS SECS

Une fermentescibilité des moûts relativement faible provient sans conteste du débourbage et des carences nutritionnelles qui en découlent. On a pu montrer que le débourbage intervient de trois manières : 1) en éliminant une partie de la microflore ; 2) en privant les cellules restantes d'une sorte d'effet support et peut-être d'une certaine quantité d'oxygène retenue dans ces fines particules ; 3) en appauvrissant le milieu de nutri-

ments contenus dans les bourbes et susceptibles de diffuser dans le moût au cours de la fermentation (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975).

Dans un cas particulier, pour une perte de fermentescibilité due au débourbage chiffrée à environ 37 p. 100 de la fermentescibilité du moût non débourbé, 10 p. 100 revenait à l'élimination d'une partie des levures, 10 p. 100 à l'effet support, mais surtout 20 p. 100 à la déficience en nutriments. On explique ainsi que, toutes choses égales y compris la concentration cellulaire initiale ajustée par ensemencement, on relève, dans le moût non débourbé en fermentation, des populations levuriennes maximales doubles de celles du moût débourbé (HADJINICOLAOU, 1979).

Cependant, le plus généralement, les populations atteignent, même dans les moûts débourbés, des densités relativement importantes, apparemment suffisantes ; pourtant la fermentation s'arrête et laisse du sucre résiduel. Les difficultés de fermentation ne peuvent pas s'expliquer uniquement par des considérations de croissance. La notion de survie des populations non proliférantes, décrite plus loin dans cet article, apporte des éléments nouveaux pour l'interprétation de ce fait.

II. — CAS DES VINS BLANCS LIQUOREUX

Dans les moûts correspondants, l'action défavorable d'une trop forte concentration en sucre se trouve accentuée par les effets du développement de *Botrytis cinerea* sur la vendange.

Lorsque la concentration en sucre augmente exagérément dans le moût, le métabolisme des levures est affecté tout au long du cycle de croissance (fig. 2) ; l'induction en fermentation est retardée, la vitesse fermentaire ralentie, la quantité de sucre dégradée, diminuée.

D'un autre côté, des essais de fermentation de mélanges en proportions variables de moûts « très botrytisés » (420 g par l de sucre) et sain (220 g par l de sucre), mais ramenés à la même teneur en sucre par addition de saccharose montrent que, plus le mélange est riche en moût botrytisé, plus la fermentation est lente ; simultanément la quantité de sucre transformée est moins importante (fig. 3).

En outre, pour une même vendange parasitée par *Botrytis cinerea* la fermentescibilité du moût dépend des modalités de son extraction. Dans un essai, on a recueilli des échantillons de moût à différents moments de l'extraction effectuée au cours du pressurage. Les différents moûts sont débourbés par décantation après sédimentation d'une nuit à — 4 °C, ajustés à la même concentration en sucre (326 g par l) et au même pH (3,65) ; ils fermentent spontanément au laboratoire en semi-anaérobiose à 25 °C. Les populations initiales sont sensiblement du même ordre (5 X 10^6 cellules par ml en moyenne) dans tous les cas (LUCMARET, 1978) (fig. 4).

Chaque moût possède une fermentescibilité propre. L'écart maximum entre les poids de sucre fermentés dans les différents lots est de 50 g

par l. Le jus de goutte présente la fermentation la plus complète, bien qu'elle ne soit pas la plus rapide au départ. L'émiettage de la vendange,

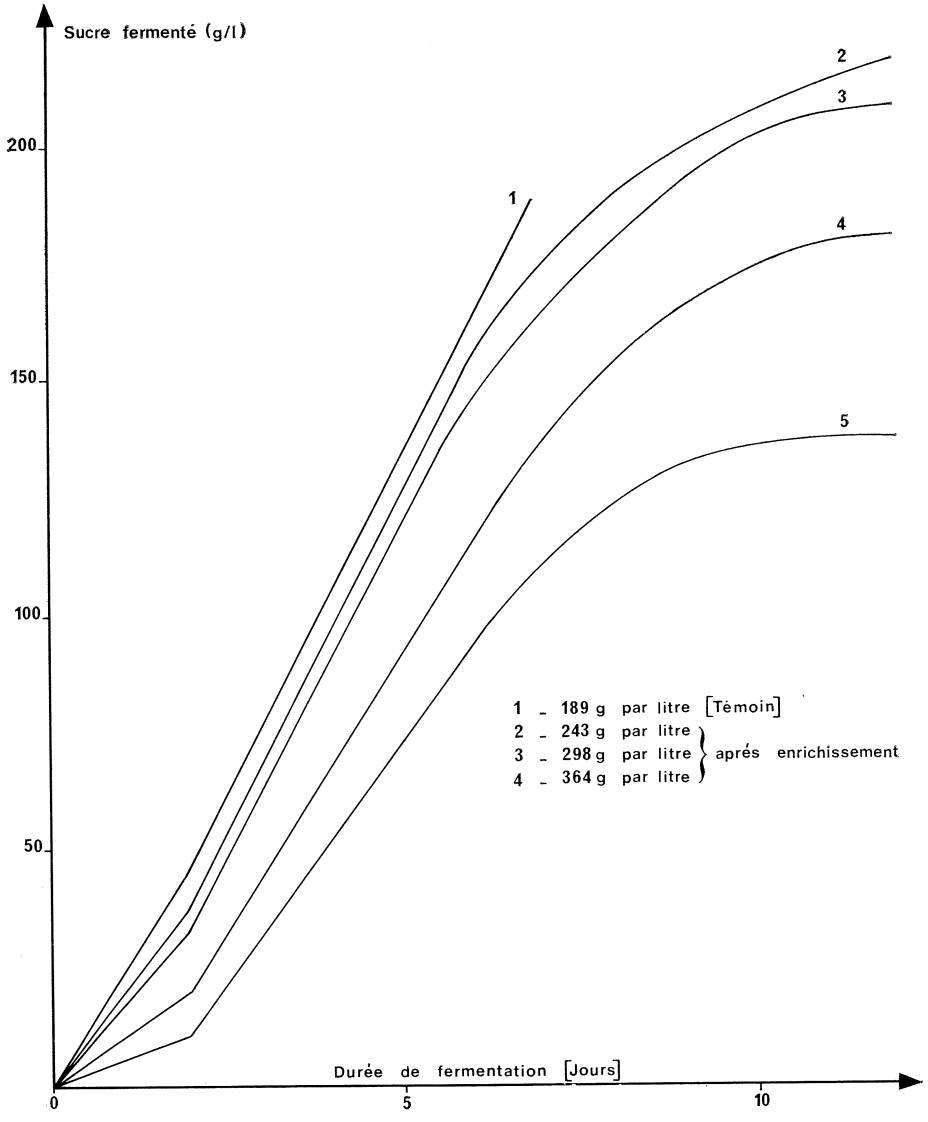


Fig. 2. — Influence de la concentration initiale en sucre sur la fermentescibilité du moût de raisin sain.

qui précède chaque nouvelle pressée, conduit à un jus d'une fermentescibilité maximale ; inversement, à l'issue d'un pressurage prolongé, on obtient un moût d'une fermentescibilité diminuée.

Ces résultats montrent que, pour une qualité de vendange déterminée, la fermentescibilité du moût est liée à la technologie de son extraction ; d'autres observations montrent une intervention dans ces phénomènes du

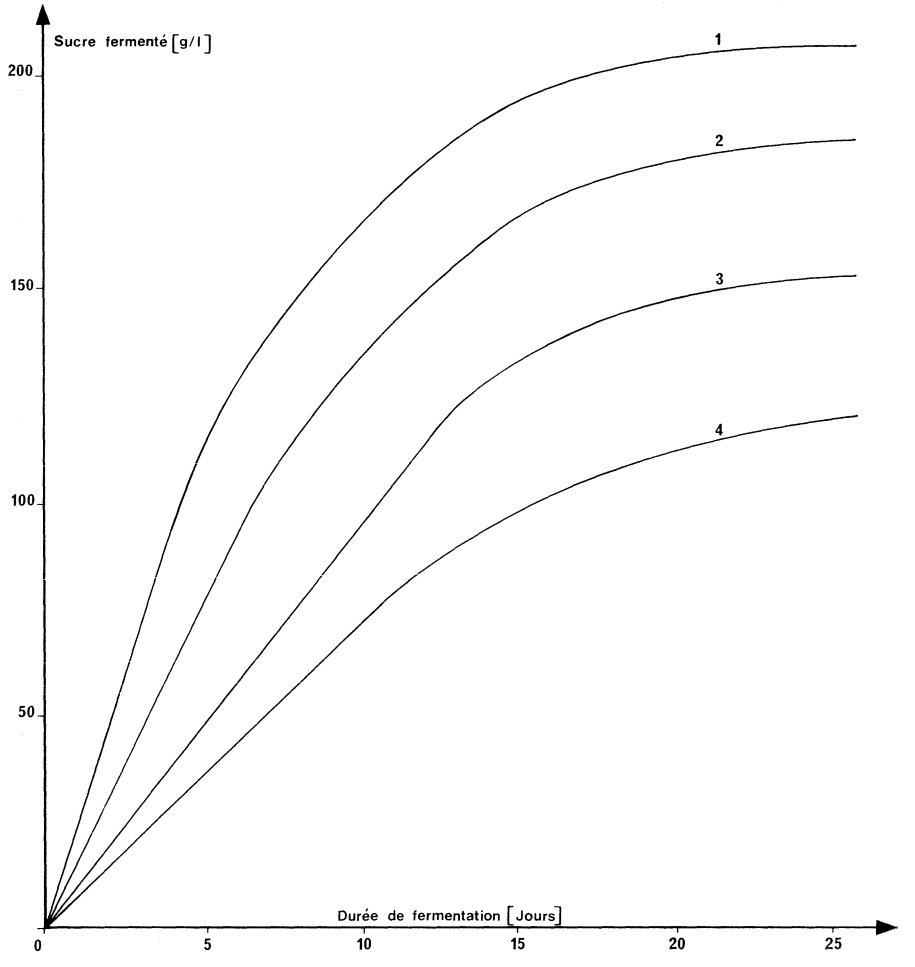


Fig. 3. — Influence de la surmaturation et du développement de **Botrytis cinerea** sur la fermentescibilité des moûts.
A = moût de raisin parasité par **Botrytis cinerea** (420 g de sucre par litre)
B = moût de raisin sain (220 g de sucre par litre)
1 : 1/4 de A + 3/4 de B
2 : 1/2 de A + 1/2 de B
3 : 3/4 de A + 1/4 de B
4 : A
Les teneurs initiales en sucre des quatre moûts ont été ajustées, avant fermentation, à 420 g par litre par addition de glucose ; les pH ont également été amenés à des valeurs identiques.

type et de la conduite du pressoir. On peut donc suggérer que les substances inhibitrices des levures se trouvent intimement fixées sur des particules du raisin, puisque seulement extractibles par les plus fortes et les plus longues pressées.

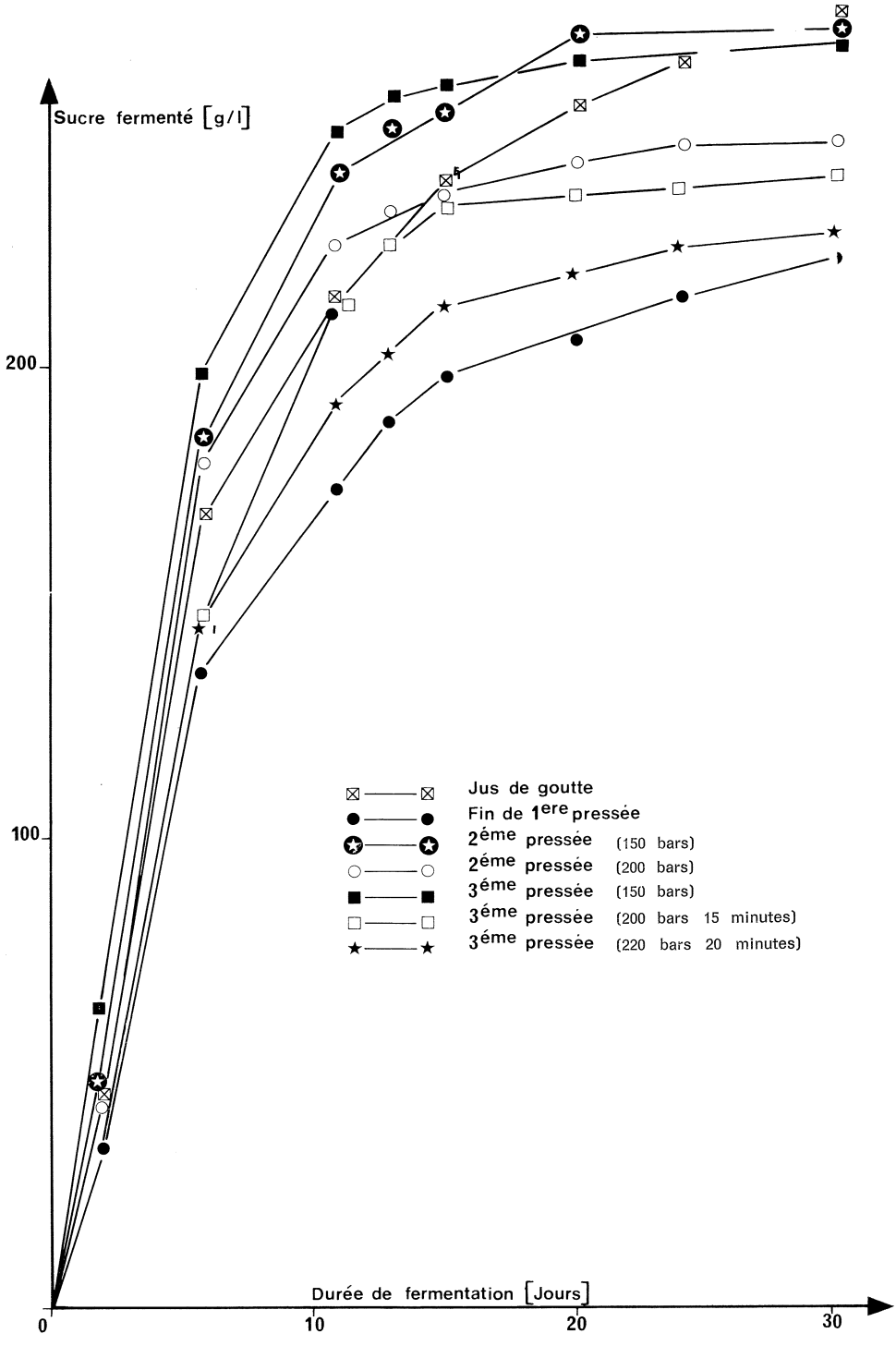


Fig. 4. — Influence des techniques d'extraction sur la fermentescibilité du moût.

III. — LES ARRETS DE FERMENTATION

L'étude des caractéristiques de la fermentation en blanc montre que, quelles que soient les causes technologiques ou naturelles, les arrêts de fermentation ont une même origine au niveau des levures. Il s'agit rarement d'un nombre insuffisant de cellules, résultant d'une croissance trop limitée ; en effet, dans des moûts qui subissent des arrêts de fermentation, on relève le plus souvent des populations totales du même ordre que dans d'autres de même type, mais ayant fermenté complètement. La fermentation s'arrête par suite d'une altération du métabolisme des cellules non proliférantes qui conduisent la deuxième partie de la fermentation ; cette altération coïncide avec le début de la phase de déclin ; elle est variable en fonction de différentes conditions propres à la fermentation. Les causes sont probablement multiples : *a)* épuisement du milieu en certaines substances indispensables aux levures, autres que le sucre ; *b)* accumulation de déchets métaboliques toxiques pour la cellule, notamment l'alcool ; *c)* modifications dans la structure même de la levure (LARUE, 1978). La conséquence est une chute progressive du taux de viabilité des populations, d'où une sorte d'auto-freinage de la fermentation jusqu'à l'arrêt total.

Différents essais d'interprétation de ce phénomène ont été suggérés au niveau moléculaire et cellulaire. Selon HOOGERHEIDE (1977) il s'agirait d'une carence cellulaire en transporteurs d'énergie (ADP) ; selon STREHAIANO et *al.* (1978) les levures sont tuées lorsque la concentration intracellulaire en alcool devient trop élevée du fait de sa trop lente désorption. Les deux hypothèses paraissent plausibles et les deux mécanismes pourraient intervenir simultanément ; mais ils sont pour le moment insuffisants pour interpréter les différences de comportement des levures, observées dans la pratique de la vinification.

L'œnologue sait par expérience combien il est difficile d'induire, à l'aide de levures exogènes jeunes, une nouvelle fermentation dans un vin possédant 5 à 20 g par l de sucre résiduel ; tout se passe comme si, dans certaines conditions, les levures excrétaient des substances toxiques, outre l'éthanol, capables de les inhiber elles-mêmes et les populations nouvelles ultérieurement introduites.

LA STIMULATION DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

I. — INCIDENCE DES ACTIVATEURS DE CROISSANCE

L'addition d'activateurs de croissance, phosphate biammonique et thiamine, permet souvent de doubler la population levurienne maximale ; il en découle une vitesse fermentaire accrue pendant les premiers jours de la fermentation. Cependant dans les moûts riches en sucre (fig. 5), l'écart avec la fermentation du moût témoin diminue en fonction du temps ; à l'arrêt spontané de la fermentation, la quantité de sucre fermentée n'est pratiquement pas modifiée.

L'efficacité des activateurs de croissance varie selon les conditions de milieu (RIBÉREAU-GAYON, 1976). Elle dépend d'abord de la teneur du moût de raisin en ces éléments, difficilement contrôlable ; elle est aussi

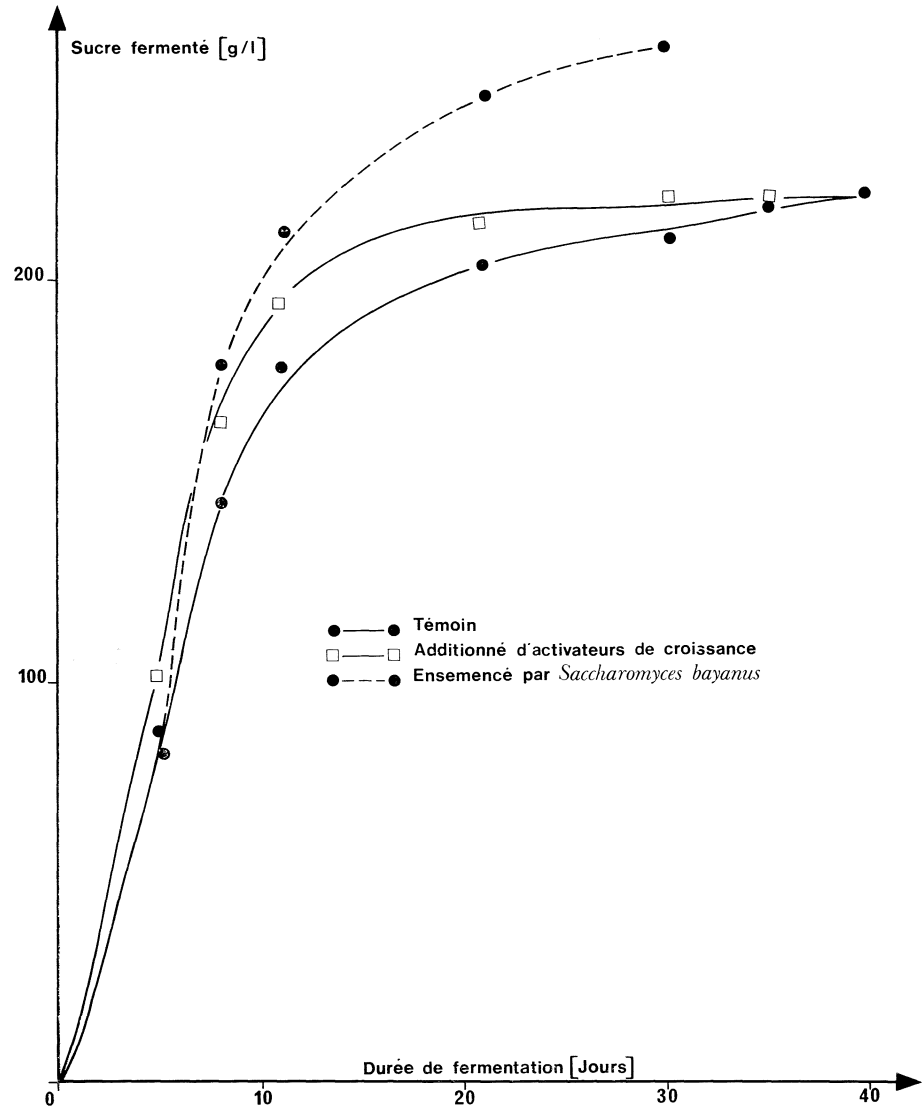


Fig. 5. — Influence de l'addition d'activateurs de croissance ou de levures alcoogènes sur la fermentescibilité du moût.

liée à la concentration cellulaire du moût au moment de l'addition des activateurs et à la nature de la microflore. Pour qu'elle soit maximale, il faut que ces nutriments soient fournis à une population peu nombreuse,

en latence, qui l'utilisera pendant sa croissance ; ils doivent donc être ajoutés avant le départ de la fermentation ; apportés plus tardivement ils demeurent sans effet. En outre, certaines espèces levuriennes manifestent des besoins azotés et vitaminiques plus importants qui les rendent particulièrement sensibles à une supplémentation du milieu. Dans un moût à teneur en sucre modéré, appauvri en nutriments et en levures par un débourbage sévère, les activateurs favorisent une multiplication rapide ; ils augmentent donc la population de levures à potentiel enzymatique élevé et par conséquent ils améliorent la fermentation.

Mais les activateurs sont sans effet sur la viabilité des levures dans leur phase de déclin. On explique ainsi que, dans les moûts riches en sucre destinés à la vinification en liquoreux, la stimulation observée les premiers jours s'efface peu à peu ; les activateurs ont peu d'incidence sur le terme de la fermentation qui est obligatoirement prolongée dans la phase de déclin, par suite de la quantité importante de sucre qui doit être dégradée.

II. — INTERET DU LEVURAGE

Cette technique est largement facilitée depuis ces dernières années par l'apparition dans le commerce des levures sèches à haute activité (LAFON-LAFOURCADE et RIBÉREAU-GAYON, 1976).

a) Incidence de la concentration levurienne à l'ensemencement

Lorsqu'on ensemence un moût de raisin avec des poids croissants de 10 mg à 10 g par l de levures sèches totales (contenant de 15.10^4 à 18.10^7 cellules par ml) *Sacch. cerevisiae,* on observe (tableau I) :

1) Le taux de viabilité de la population introduite diminue en fonction de l'importance de l'inoculum, c'est-à-dire que le nombre maximum de cellules viables en cours de fermentation n'est pas proportionnel au nombre total de levures ajoutées au moment du levurage ; les cellules viables varient de 1 à 4 pour une gamme d'ensemencement échelonnée de 1 à 1000.

2) les populations maximales viables sont atteintes d'autant plus rapidement que l'inoculum est plus élevé.

3) tout se passe comme si le moût possédait la capacité d'assurer une croissance déterminée quelle que soit l'importance de l'ensemencement, au-dessus d'une certaine valeur minimum.

4) la fermentation est d'autant plus rapide à ses débuts que l'ensemencement est fort ; 190 g par l de sucre sont transformés entre 5 et 12 jours, selon que le poids de levure introduit varie de 10 g par l à 10 mg par l. Mais dans un moût riche en sucre, les levures doivent continuer à fermenter pendant la phase de déclin ; les populations viables deviennent du même ordre quel que soit le taux d'ensemencement ; finalement, dans

TABLEAU I

Incidence de la concentration levurienne à l'ensemencement sur la stimulation de la fermentation alcoolique

Sucre initial : 250 g par litre
Levure : **Sacch. bayanus**
Température de fermentation 25 °C
Anaérobiose stricte

Le sucre fermenté est exprimé en g par litre
La population levurienne est exprimée en nombre de cellules x 10^6 par millilitre

	Avant fermentation	Jour de fermentation							
		2ème	4ème	5ème	8ème	9ème	11ème	15ème	19ème
Sucre fermenté		0	30	50	120	136	167	214	231
Levures totales	0,15	2,5	40	42	34	34	36	36	30
Levures viables	0,095	1,8	6,6	11	9	10	11	11	0,96
Sucre fermenté		0	40	72	148	158	191	228	240
Levures totales	1	4	36	45	34	36	30	30	32
Levures viables	0,55	2,8	11	25	13	14	11	8	0,88
Sucre fermenté		10	70	89	166	174	207	236	241
Levures totales	5,2	18	50	53	36	38	32	34	34
Levures viables	2,8	5,6	23	30	14	14	14	4	0,64
Sucre fermenté		25	85	98	178	190	215	238	242
Levures totales	11	36	50	53	54	48	46	50	46
Levures viables	5,6	46	46	33	24	20	16	8	0,66
Sucre fermenté		50	235	250					
Levures totales	180	240	23						
Levures viables	36	48	40						

ce cas les quantités de sucre fermentées au total et la durée même de la fermentation sont peu modifiées.

5) un ensemencement massif (10 g par l), irréalisable dans la pratique, assure une fermentation quasi-explosive avec une faible croissance. Pour une raison inexpliquée, le rendement de la transformation du sucre en alcool est moins bon ; il faut dans ce cas 19 g de sucre pour produire 1 °GL, au lieu de 17 g dans tous les autres cas d'ensemencement.

b) **Incidence de la nature de la souche**

Lorsqu'on ajoute à l'ensemencement naturel d'un moût, titrant 320 g par l de sucre, une levure *Sacch. bayanus* (100 mg par l) à haut pouvoir alcoogène, la vitesse fermentaire (fig. 5) est identique à celle du moût fermentant spontanément, sous l'action des seules levures indigènes *(Sacch. cerevisiae),* pendant les cinq premiers jours ; mais du 11e au 20e jour, période correspondant à la première partie de la phase de déclin, pour des populations levuriennes du même ordre d'importance, *Sacch. bayanus* fermente beaucoup plus de sucre que les levures indigènes. L'arrêt spontané de la fermentation intervient plus tôt et cependant 41 g par l de sucre supplémentaire sont fermentés au total lorsque les fermentations sont arrêtées.

Ces deux types d'essais montrent à l'évidence que : 1) il n'est pas possible de repousser le terme de la fermentation en augmentant le poids de l'inoculum, tout au moins entre certaines concentrations cellulaires réalisables à l'ensemencement ; 2) sauf cas particulier des populations naturelles insuffisantes (premières cuves remplies dans un chai), l'intérêt principal du levurage réside, non dans l'apport lui-même de cellules supplémentaires, mais dans le fait que ces cellules présentent des qualités particulières, plus spécialement une « capacité fermentaire » que ne possèdent pas les levures indigènes. C'est une des supériorités bien connues du levurage avec les levures sélectionnées, sur le levurage avec un « levain de cru ».

LES FACTEURS DE SURVIE DES LEVURES

Cette notion nouvelle a été récemment développée en microbiologie grâce aux travaux de l'Institut d'Œnologie ; elle présente des applications pratiques importantes en vinification car elle permet d'interpréter certaines difficultés de fermentation, indépendantes de la croissance cellulaire, mais liées à la nécessité pour les levures, se développant dans des milieux riches en sucre tels que le moût de raisin, de continuer à fermenter dans leur phase de déclin (cellules non proliférantes).

Les facteurs de croissance sont, selon LWOFF (1944), des substances que l'organisme ne peut pas synthétiser et en l'absence desquelles toute multiplication est impossible. Par analogie, on peut donner des « facteurs

de survie » la définition suivante : substances dont l'addition au milieu est susceptible de prolonger l'activité métabolique de cellules non proliférantes.

De la même manière que les activateurs de croissance (sels d'ammonium) et certains facteurs de croissance (thiamine) favorisent la multiplication des levures dans le moût de raisin, les « facteurs de survie » maintiennent une plus forte viabilité dans les populations levuriennes en phase de déclin ; il en résulte un accroissement du métabolisme fermentaire et la plus grande possibilité d'achèvement de la fermentation (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1977).

I. — BESOINS DES LEVURES EN FACTEURS DE SURVIE EN FONCTION DES CONDITIONS DE FERMENTATION

Trois types de facteurs de survie ont été mis en évidence (LARUE, 1978) : certains stérols (ergostérol, cholestérol, lanostérol), l'acide oléanolique constituant essentiel de la cire cuticulaire du raisin, une hormone peptidique, l'ocytocine. Les stérols et l'acide oléanolique étaient décrits jusqu'ici comme facteurs de croissance anaérobie des levures. Le nouveau rôle fonctionnel de ces substances apparaît dans les conditions particulières de la vinification : moût préalablement aéré, ensemencé avec des levures précultivées en aérobiose (levures indigènes, levures sèches) et fermentant dans des conditions d'anaérobiose stricte.

L'action des facteurs de survie se manifeste d'une manière d'autant plus accusée que la température de fermentation est plus élevée (fig. 6) et le pH lui-même plus élevé ; elle apparaît plus tôt, au cours de la fermentation, lorsque le moût provient de vendanges parasitées par *Botrytis cinerea ;* elle est d'autant plus importante que le moût de raisin est riche en sucre du fait que les populations levuriennes sont justement contraintes à fermenter plus longuement pendant la phase du déclin.

L'addition de stéroïdes au moût de raisin exerce un effet synergique à l'aération momentanée effectuée dans la phase de multiplication des levures (« remontages » au début de la fermentation) ; elle peut également ajouter son action à celle des activateurs de croissance (fig. 7). Dans ces deux conditions, on observe les populations les plus importantes, ayant en outre les plus grandes possibilités de survie ; la stimulation est maximale, car elle intervient à la fois au niveau de la croissance et au niveau de la survie pendant la phase de déclin.

D'un autre côté, l'intervention des facteurs de survie se traduit aussi au niveau du métabolisme fermentaire par une production augmentée d'éthanol et de glycérol, mais également par des modifications dans les concentrations en esters d'acides gras ; ceci pourrait avoir une incidence sur la composition du pool aromatique des vins. En outre, l'acide oléanolique et parfois les stérols stimulent la fermentation de l'acide malique par *Sacch. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique.

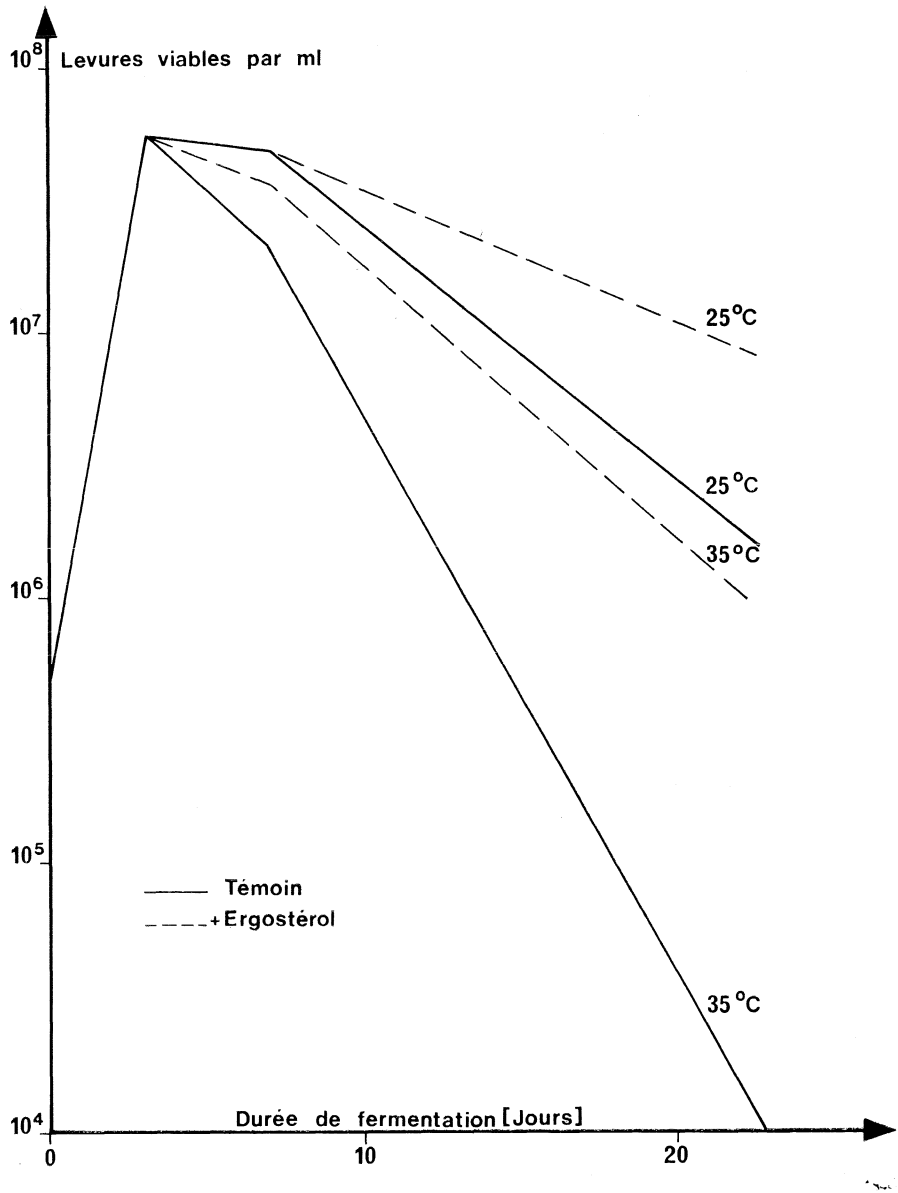


Fig. 6. — Influence des stéroïdes sur les levures au cours de la fermentation d'un moût de raisin frais à diverses températures.

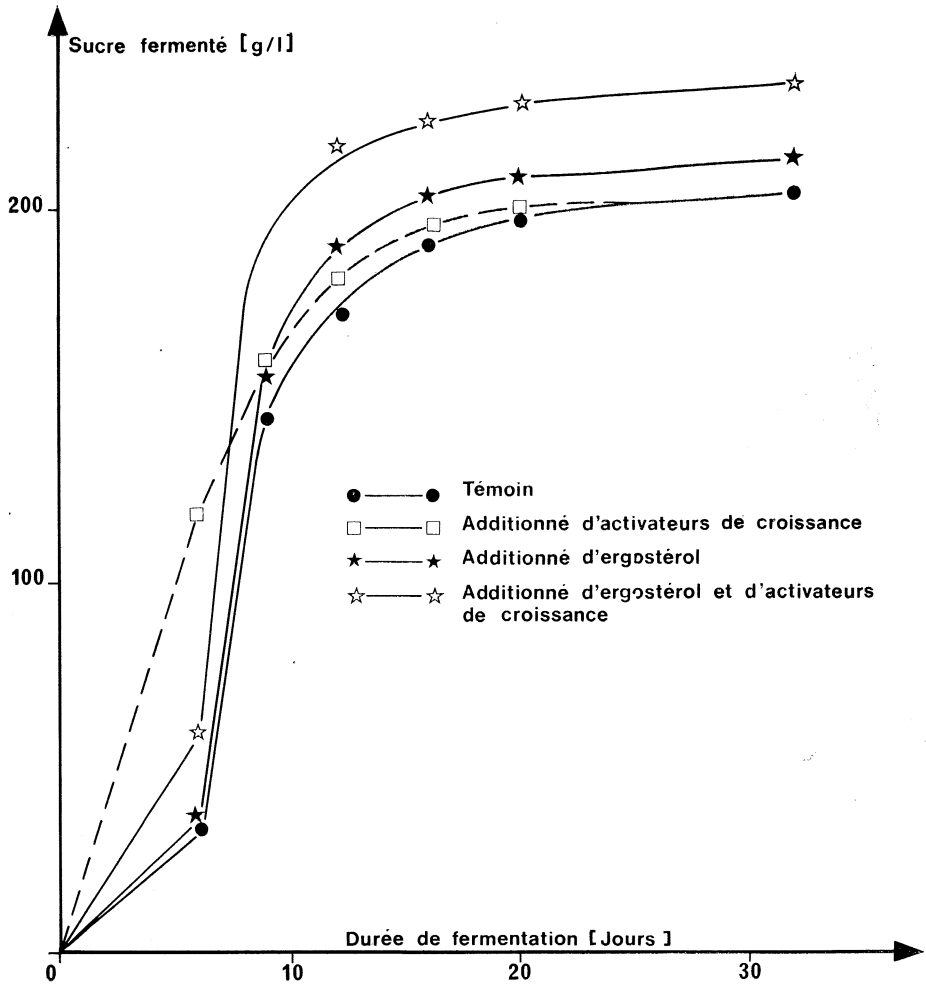


Fig. 7. — Influence de l'addition d'ergostérol et d'activateurs de croissance sur la fermentation anaérobie d'un moût de raisin frais.

II. — MODE DE PRECULTURE ET ACTIVITE FERMENTAIRE DES LEVURES DANS LE MOUT DE RAISIN

Un certain nombre d'observations (tableau II) mettent en évidence l'importance du mode de préculture de l'inoculum sur le besoin en stéroïdes et en conséquence sur l'activité fermentaire des populations levuriennes dans les conditions de la vinification, c'est-à-dire moût de raisin initialement aéré fermentant en anaérobiose stricte :

a) Pour les levures précultivées en aérobiose (ensemencement spontané ou levures sèches), la quantité de sucre fermentée est indépendante de l'importance de l'inoculum dans une gamme d'ensemencement de

10 mg par l à 1 g par l, contenant approximativement de 10^5 à 10^7cellules par ml. Un stéroïde ajouté au moût fonctionne uniquement comme facteur de survie, il augmente la capacité fermentaire de la levure dans un milieu déterminé et remédie aux difficultés de fermentation relevant d'un inoculum exagérément faible (1 mg par l).

TABLEAU II

Influence du cholestérol en fonction de l'ensemencement sur la fermentation alcoolique du moût de raisin aéré avant ensemencement

A — Levures sèches (précultivées en aérobiose)

B — Levures précultivées en anaérobiose (en poids sec)

Sucre initial après enrichissement : 295 g par litre.

Levure sèche : **Saccharomyces cerevisiae.**

Cholestérol : 100 mg par litre.

	Ensemencement		6ème jour		13ème jour		Sucre résiduel après 1 mois
			Cellules viables	Sucre fermenté	Cellules viables	Sucre fermenté	
A	1 mg par litre	Témoin	61	120	4,8	195	69
		+cholestérol	54	92	25	176	34
	10 mg par litre	Témoin	60	120	7,2	195	58
		+cholestérol	60	112	22	208	34
	100 mg par litre	Témoin	49	120	4	198	60
		+cholestérol	50	120	18	217	30
	1 g par litre	Témoin	48	142	6,4	224	60
		+cholestérol	45	150	33	234	34
B	1 mg par litre	Témoin	45	105	17	180	88
		+cholestérol	69	120	36	210	59
	10 mg par litre	Témoin	38	112	12	187	78
		+cholestérol	55	120	41	217	50
	100 mg par litre	Témoin	25	112	15	189	75
		+cholestérol	52	125	38	220	41
	1 g par litre		21	120	9	194	64
		+cholestérol	40	120	20	225	39

b) Pour les levures précultivées en anaérobiose (levains traditionnels), la quantité de sucre fermentée est liée au taux d'ensemencement, entre 1 mg/l et 1 g/l de levures sèches. Un stéroïde ajouté au milieu fonctionne d'abord comme facteur de croissance, puis comme facteur de survie ; mais il ne parvient pas à restituer à ces organismes leur capacité fermentaire maximale, observée dans les conditions précédentes.

III. — MECANISMES D'ACTION DES FACTEURS DE SURVIE

Nous avons montré que l'addition de stérols à un milieu en fermentation contribue à l'enrichissement en stérols de la structure cellulaire (LARUE et *al.*, 1978). Une certaine teneur en stérols est indispensable à la vie de la levure ; au-dessous de 0,5 p. 100 du poids de levure sèche il n'y a plus de multiplication et au-dessous de 0,2 p. 100 il n'existe guère d'activité fermentaire appréciable dans le moût de raisin. L'assimilation levurienne des stérols ajoutés au milieu peut être importante, elle peut atteindre 300 mg/l pour le cholestérol ; mais la majeure partie est métabolisée pendant la phase de prolifération ; une infime fraction seulement participe au maintien d'un taux de stérols plus élevé dans la cellule.

TABLEAU III

Incidence d'une aération ménagée permanente et de l'addition d'ergostérol sur la teneur en stérols des levures et leur activité fermentaire

(taux de sucre initial des moûts : 249 g par l. ; levure industrielle sèche **Sacch. cerevisiae ;** population initiale : $2{,}2 \times 16^6$ cellules par ml ; taux initial en stérols des levures : 1,5 p. 100 du poids sec)

L'addition d'ergostérol est de 50 mg par l.

Le sucre fermenté est exprimé en g par l.

Les stérols des levures sont exprimés en p. 100 du poids sec.

	Anaérobiose stricte		Aération ménagée permanente	
	Témoin	+ ergostérol	Témoin	+ ergostérol
2ème jour de fermentation				
Sucre fermenté	37	36	30	27
Stérols des levures	1,6	1,4	2,7	2,8
9ème jour de fermentation				
Sucre fermenté	164	169	187	175
Stérols des levures	0,4	1,0	1,2	1,1
19ème jour de fermentation				
Sucre fermenté	170	199	246	234
Stérols des levures	0,3	0,6	1,0	0,8

Les levures précultivées en aérobiose sont particulièrement bien pourvues en stérols. Au cours de la fermentation alcoolique anaérobie du moût de raisin, saturé d'oxygène préalablement à l'ensemencement, la biosynthèse des stérols demeure restreinte et limitée aux premières heures de la croissance. Les chiffres du tableau III montrent que la teneur en stérols de la

population levurienne ne cesse de décroître, brusquement pendant la phase exponentielle de croissance, puis plus lentement. Le même tableau montre qu'une aération ménagée permanente du moût en fermentation favorise une importante biosynthèse des stérols au début de la phase exponentielle de croissance ; ensuite la teneur en stérols des levures diminue mais elle demeure plus élevée qu'en anaérobiose stricte tout au long de la fermentation. Ceci suggère que, en aération ménagée, les besoins sont couverts par les réserves de l'inoculum, augmentées de la quantité de stérols formée dans les premières heures de la croissance.

La même expérience indique l'utilisation des stérols ajoutés au moût pour enrichir la structure cellulaire, exclusivement dans le cas de fermentation anaérobie.

Enfin, un contact momentané avec l'oxygène, même de courte durée, suffit pour induire une biosynthèse non négligeable des stérols chez des levures précultivées en aérobiose, en fermentation en anaérobiose stricte depuis trois jours dans le moût de raisin (Tableau IV). Mais la teneur en

TABLEAU IV

Incidence d'une aération momentanée et de l'addition de cholestérol sur la teneur en stérols des levures et leur activité fermentaire

Taux de sucre initial : 298 g par l.
Levure industrielle sèche
Sacch. cerevisiae
Population initiale : $3,6 \times 10^6$ cell. par ml.
Teneur initiale en stérols des levures : 1,5 p. 100 du poids sec.
L'addition de cholestérol est de 265 mg par l.

Les stérols des levures sont exprimés en p. 100 du poids sec.

	Anaérobiose stricte		Aération momentanée au 3ème jour	
	Témoin	+ cholestérol	Témoin	+ cholestérol
3ème jour de fermentation (6 h après l'aération)				
Sucre fermenté	79	80	86	90
Stérols des levures	0,45	0,85	0,70	1,10
33ème jour de fermentation				
Sucre fermenté	178	215	217	240
Stérols des levures	0,20	0,40	0,40	0,55

stérols des levures demeure inférieure à ce qu'elle serait dans le cas d'une aération ménagée permanente du milieu. Cette observaton permet

d'apporter une interprétation de l'effet activateur de l'oxygène introduit au début de la fermentation du moût de raisin, effet pour lequel jusqu'ici on n'avait pas trouvé d'explication satisfaisante.

Certaines contraintes de milieu interviennent défavorablement sur la teneur en stérols des levures, notamment une température trop élevée et certaines carences vitaminiques. Dans ces conditions une supplémentation du moût en ergostérol ou cholestérol permet à la levure de conserver une structure cellulaire plus riche en stérols.

En résumé, la biosynthèse levurienne des stérols nécessite l'oxygène moléculaire ; elle se trouve donc rapidement interdite dans le moût en fermentation en anaérobiose stricte. Une supplémentation du moût en stérols remédie à cette carence, également l'introduction d'oxygène.

Des travaux dûs à DEMEL et de KRUYFF (1976) montrent que les stérols interviennent en tant que régulateurs de la perméabilité des membranes. Les stérols ajoutés au milieu favorisent une structure cellulaire plus riche en stérols et en conséquence une meilleure capacité d'échange de la cellule avec le milieu.

En ce qui concerne l'acide oléanolique, malgré sa parenté de structure avec les stérols, il n'intervient pas sur l'enrichissement en stérols des levures ; BRECHOT et *al.*, (1973) ont montré qu'il inhibe partiellement l'activité de la glutamate-déshydrogénase. Il agirait directement sur les synthèses protéiques. Il en est peut-être de même de l'hormone peptidique, l'ocytocine. En l'état actuel de nos connaissances, nous ignorons pratiquement tout des mécanismes d'action de ces substances qui ont, comme les stérols, une activité « facteur de survie ».

CONCLUSIONS

La vinification en blanc pose encore bien des problèmes que l'analyse du contexte microbiologique permet de mieux comprendre. On met ainsi en évidence qu'une fermentation difficile et un arrêt prématuré de la fermentation relèvent le plus souvent, non d'un défaut de croissance, comme on l'a admis jusqu'à maintenant, mais d'une inhibition de l'activité fermentaire de populations levuriennes non proliférantes qui sont chargées d'assurer les fins de fermentation dans les milieux riches en sucre (moûts de raisin). Cette inhibition s'exerce sous l'effet de certaines carences de la levure et de l'action toxique de déchets métaboliques levuriens ; elle est liée à différentes conditions imposées par les contraintes technologiques. En particulier, le débourbage dans l'élaboration des vins blancs secs et l'intervention de *Botrytis cinerea* dans le cas des vins blancs liquoreux, sont des facteurs impliqués dans ces difficultés de fermentation. Une étude plus détaillée devrait permettre de préciser les conditions permettant d'assurer à la fois, les qualités organoleptiques recherchées et une capacité nutritionnelle du moût suffisante. En particulier, en ce qui concerne la « pourriture noble », nécessaire à l'obtention des Sauternes, elle peut

conduire à une concentration excessive (taux de sucre supérieur à 350 g/l) qui entraîne de considérables difficultés de fermentation (avec pour conséquence des taux importants d'acidité volatile) sans amélioration indiscutable de la qualité.

Les études théoriques sur cette question permettent de préciser les moyens actuellement à la disposition de l'œnologue pour éviter ces difficultés, le champ de leur action et leurs limites.

Les activateurs de croissance (sels d'ammonium, thiamine) peuvent accélérer la fermentation à ses débuts et même en repousser le terme, dans la mesure où ils remédient à la carence du moût en nutriments azotés (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1962) ; ils agiraient dans ce cas non seulement sur la croissance mais aussi sur l'activité fermentaire.

La « capacité fermentaire » d'une population levurienne définie comme la quantité maximale de sucre susceptible d'être fermentée, commande le bon achèvement des fermentations ; elle dépend de la richesse nutritionnelle du moût, des conditions physiques de la fermentation, de la densité de la population levurienne atteinte au terme de la croissance ; mais elle est aussi directement liée aux qualités spécifiques des souches levuriennes, à leurs caractères génétiques. En conséquence, un des moyens susceptible de prévenir les difficultés de fermentation réside en l'implantation dans le moût d'une microflore adéquate.

Les préparations industrielles de levures sèches, sélectionnées pour un certain nombre de propriétés bien définies (pouvoir alcoogène, faible production d'acidité volatile et d'acides cétoniques) permettent à l'œnologue d'intervenir sur la microflore ; les progrès de la génétique conduiront sans aucun doute à la sélection de souches plus performantes encore. Dans les conditions de leur emploi en Bordelais, c'est-à-dire non en substitution à la microflore naturelle d'un cru, mais en complément à la population indigène, elles ne modifient pas de manière significative les qualités organoleptiques des vins. Grâce à cette pratique des progrès certains ont été réalisés récemment dans la conduite des vinifications.

Cependant, le problème des arrêts de fermention est loin d'être totalement résolu. La notion de « facteur de survie » constitue sans aucun doute une autre démarche dans l'approche de ce problème et ouvre à la recherche une orientation nouvelle. Il en existe probablement d'autres, mais nous avons mis trois classes de « facteurs de survie » en évidence ; elles ont une efficacité équivalente au plan de l'activation fermentaire, mais distincte dans leur mode d'action au niveau cellulaire : les stérols, l'acide oléanolique et l'ocytocine. Dans les conditions de la vinification, c'est-à-dire moût préalablement aéré, ensemencé avec un levain précultivé en aérobiose et fermentant en anaérobiose stricte, ces substances n'interviennent pas sur la croissance, mais elles permettent aux populations

levuriennes de conserver plus longtemps leur viabilité et par conséquent de fermenter une plus grande quantité de sucre.

L'addition au moût de ces substances peut pallier certaines difficultés de fermentation relevant d'une concentration en sucre trop forte, d'une température trop élevée, d'un pH trop bas, de certaines carences vitaminiques, d'un inoculum trop faible ou insuffisamment aéré. Elle ajoute éventuellement son action à celle qui provient de la stimulation de la croissance par une supplémentation du moût en phosphate biammonique ou par aération au début de la fermentation.

Les facteurs de survie interviennent sur le métabolisme fermentaire : augmentation du taux de certains produits secondaires, stimulation dans certains cas de la dégradation de l'acide malique, appauvrissement en azote des levures en fin de fermentation.

En ce qui concerne le mode d'action des stérols ajoutés au moût, on sait maintenant qu'une certaine teneur en stérols de la cellule est indispensable à l'activité fermentaire des levures. Les besoins de la levure peuvent être satisfaits par addition de stéroïdes, ou en ménageant certaines conditions d'aération du milieu. Une température de fermentation relativement basse évite une perte trop brutale des stérols de la levure. On apporte ainsi une interprétation théorique des deux opérations de la vinification en rouge, l'aération et la réfrigération qui sont d'autant plus indispensables pour l'obtention d'une fermentation alcoolique complète que la teneur initiale en sucre est élevée.

D'un autre côté, ces recherches mettent en évidence l'incidence du mode de préculture des levures sur leur activité ultérieure. C'est une des qualités essentielles des levures indigènes, et non des moindres, d'être développées en aérobiose, donc bien pourvues en facteurs de survie. Cette même propriété se retrouve chez les levures industrielles ; elle est en partie responsable de leur efficacité. Cette propriété permet d'expliquer aussi l'efficacité limitée des levains traditionnels préparés par fermentation en anaérobiose stricte.

Bien entendu il est hors de propos de supplémenter le moût en certains facteurs de survie, mais on connaît mieux les conditions qui suscitent leurs besoins et a contrario celles qui favorisent la survie des levures. Rappelons cependant que l'acide oléanolique est présent naturellement sur la pellicule de raisin (RADLER, 1968) ; sa carence en vinification en blanc pourrait participer au déclenchement précoce du ralentissement des fermentations. L'intérêt technologique de cette substance naturelle du raisin justifie amplement les recherches conduites à l'heure actuelle pour déterminer son mode d'action au niveau cellulaire.

La notion de facteur de survie complète celle de facteur de croissance. Elle permet de proposer une interprétation beaucoup plus précise des causes et des mécanismes des difficultés de fermentation, indis-

pensable pour accéder à des solutions pratiques susceptibles de les résoudre.

Manuscrit reçu le 19 mars 1979.

RÉSUMÉ

Les contraintes de la vinification en blanc imposent aux levures du moût de raisin des conditions de vie particulières, à l'origine de certaines difficultés de fermentation. Il s'agit fréquemment d'une inhibition de l'activité fermentaire de populations non proliférantes. Dans ce cas, les activateurs de croissance restent inefficaces ; l'intérêt du levurage réside dans les qualités de la souche implantée. La notion de facteur de survie constitue une démarche nouvelle dans l'étude de ces problèmes notamment celui des arrêts de fermentation ; elle est susceptible de déboucher sur des solutions pratiques.

SUMMARY

The constraints of white wine vinification impose on the yeasts in the must of raisins special conditions of life. It frequently concerns an inhibition of fermentation activity of non proliferating populations. In this case, the growth-activators are ineffective. The advantage of inocculation lies in the qualities of the variety used. The idea of a survival factor constitutes a new step in the study of problems associated with premature stops of the fermentation. These studies might eventually lead to practical solutions.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Technologie der Weissweinherstellung bringt für die Hefen besondere Lebensbedingungen mit sich, die gewisse Gärungsschwierigkeiten hervorrufen können, häufig wegen spärlicher Vermehrung. In diesem Fall bleiben die Wachstumsförderer erfolglos. Der Vorteil des Hefezusatzes besteht in den Qualitäten der gebrauchten Hefenart. Die Berücksichtigung der Ueberlebensfaktoren sind ein neuer Schritt im Studium dieser Probleme, im speziellen des Anhaltens der Gärung. Sie können möglicherweise zu praktischen Lösungen führen.

RESUMEN

Las exigencias de la vinificacion en blanco imponen a las levaduras presentes en el mosto de uva, condiciones de vida particulares, origen de algunas dificultades en la fermentación. Se trat, frecuentemente, de inhibicion de la actividad fermentativa de levaduras no proliferantes. En este caso, los activadores del crecimiento son ineficaces, el interés de la siembra de levaduras depende de la calidad de la cepa que se utilice. La noción del factor de supervivencia es un nuevo passo en el estudio de estos problemas, espcialmente en la parada de la fermentación y puede dar lugar a soluciones prácticas.

RIASSUNTO

Gli ostacoli della vinificazione in bianco impongono ai lieviti del mosto d'uva, condizioni di vita particolari all'origine di certe difficoltà di fermentazione. Si tratta spesso di un'inibizione della fermentazione di popolazioni non proliferanti. In questo

caso, gli attivatori di accrescimento rimangono inefficaci ; l'interesse della lievitatura siede nelle qualità del clone impiantato.

La nozione di fattore di sopravvivenza costituisce un passo nuovo nello studio di questi problemi, speciè colui delle soste di fermentazioni ; ed è suscettibile di sboccare su soluzioni pratiche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMERINE R.M., 1973. Les levains en œnologie. *Coll. Intern. Œnologie, Arc et Senans, Numéro spécial Vignes et Vins* 46-51.

BRÉCHOT P., DUPUY P. et CROSON M., 1973. Action of oleanolic acid on glutamate deshydrogenase activity. *Third International Specialized Symposium on yeasts,* Otaniemi, Finland.

DEMEL R.A. et de KRUYFF B., 1976. The function of sterols in membranes *Biochem. Biophys. Acta,* 457, 102-132.

GALZY P., 1973. Génétique des levures en œnologie. *Coll. Intern. Œnologie, Arc et Senans, Numéro spécial Vignes et Vins* 11-18.

HADJINICOLAOU D., 1979. De l'incidence de quelques techniques œnologiques sur la qualité des vins. Le débourbage. *Diplôme d'Etudes Approfondies,* Université de Bordeaux II.

HOOGERHEIDE J.C., 1977. « Studies of the function of ATP and its free energy transfer during anaerobic glucose metabolism of bakers yeast » in *Alcohol Industry and Research,* Frenckellin Kirjapaino Oy éd., Helsinki.

KUNKEE R. et AMERINE A.M., 1970. « Yeasts in Wine Making » in *The Yeasts,* Academic Press, London.

LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1976. Premières observations sur l'utilisation de levures sèches en vinification en blanc. *Connaissance Vigne Vin,* **10**, N° 3, 277-296.

LAFON-LAFOURCADE S., LARUE F., BRÉCHOT P. et RIBÉREAU-GAYON P., 1977. Les stéroïdes, facteurs de survie des levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin *C.R. Acad. Sc., 284 D,* 1939-1942.

LARUE F., 1978. Les facteurs de survie de la levure et leur rôle sur la fermentation alcoolique du moût de raisin. *C.R. Acad. Sc., 284 D,* 1939-1942.

LARUE F., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1978. Relation entre la teneur cellulaire en stérols et l'activité fermentaire des levures dans le moût de raisin Rôle fonctionnel des stéroïdes. *C.R. Acad. Sc., 287 D,* 1445-1448.

LARUE F., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1979. Les différents rôles fonctionnels des stéroïdes sur les levures dans le moût de raisin en fermentation. Notion de facteur de survie. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur,* 130 A, 231-243.

LUCMARET V., 1978. Métabolisme fermentaire des levures et des bactéries lactiques dans les moûts de raisin riches en sucre ; formation d'acide acétique. *Diplôme d'Etudes Approfondies,* Université de Bordeaux II.

LWOFF A., 1944. *L'évolution physiologique,* Hermann éd., Paris.

RADLER F., 1968. La cire cuticulaire des grains de raisin et des feuilles de vigne. *Connaissance Vigne Vin,* **1**, N° 2, 271-294.

RIBÉREAU-GAYON P., LAFON-LAFOURCADE S. et BERTRAND A., 1975. Le débourbage des moûts de vendange blanche. *Connaissance Vigne Vin,* **9**, N° 2, 117-139.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1975. *Sciences et Techniques du Vin, Tome 2,* Dunod éd., Paris.

STREHAIANO P., MORENO M. et GOMA G., 1978. Fermentation alcoolique : influence de la concentration en glucose sur le taux de production d'éthanol et le taux de croissance. *C.R. Acad. Sc., 286 D,* 225-228.