Connaissance Vigne Vin, 1984, **18**, N° 4, 219-224.

RELATION ENTRE LES DIFFICULTES DE FERMENTATION ET CERTAINES ACTIVITES ENZYMATIQUES DE LA LEVURE.

Françoise LARUE, 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

Dans un milieu nutritif complet riche en hexoses, tel que le moût de raisin, la fermentation des derniers grammes de sucre par *Saccharomyces cerevisiae* est toujours lente et difficile ; elle débouche sur un arrêt prématuré de la fermentation qui précède une régression brutale de la population viable. Pour achever la dégradation des sucres, on peut procéder à un deuxième ensemencement ; cependant, dans un tel milieu préfermenté, la croissance des levures et leur activité fermentaire restent limitées (LAFON-LAFOURCADE, 1983). L'éthanol et les acides gras (GENEIX et *al.*, 1983) ont été signalés parmi les inhibiteurs responsables de ces phénomènes.

Le métabolisme des sucres se produit en deux étapes (GUPTA et *al.*, 1981) : a) transport à travers la membrane jusque dans l'espace intracellulaire ; b) utilisation selon différentes voies métaboliques. Des travaux antérieurs semblent indiquer que les mécanismes d'inhibition seraient liés en particulier à une modification de la teneur cellulaire en stérols (LARUE et *al.*, 1980) qui agit sur la perméabilité membranaire (DEMEL et *al.*, 1976 ; LARUE et *al.*, 1982). Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il importait de s'assurer que dans les milieux en arrêt de fermentation, les enzymes de la levure, impliquées dans la dégradation des sucres, conservent une activité potentielle.

En présence de concentrations en glucose, même relativement faibles (2 p. 100), la voie métabolique empruntée par les levures pour dégrader les hexoses est exclusivement celle de la fermentation (SLONIMSKI, 1955 ; TRAVERSO-RUEDA, 1980) ; deux des enzymes-clefs sont l'hexokinase (HK) et l'alcool déshydrogénase (ADH).

En fait, la levure possède deux isoenzymes HK non spécifiques qui assurent la phosphorylation du glucose, du fructose et du mannose ; elle possède aussi une glucokinase spécifique (ETIAN, 1980). L'activité des

deux isoenzymes est inhibée lorsque l'éthanol s'accumule dans la cellule (NAVARRO et *al.*, 1982).

Selon les conditions de culture (ELTAYEB et *al.*, 1982), *Sacch. cerevisiae* synthétise trois isoenzymes ADH I, II et III dépendantes de NAD^+. Néanmoins, en vinification la levure développe une seule activité ADH I (SINGH et *al.*, 1976); sa valeur, déterminée en fin de fermentation, varie selon les souches (SINGH et *al.*, 1977).

Ce travail se propose d'étudier la relation entre l'inhibition de la fermentation et les activités globales de l'HK et de l'ADH dans les extraits acellulaires de *Sacch. cerevisiae,* au cours de la croissance en semi-aérobiose. On utilise un milieu nutritif complet contenant des teneurs en saccharose différentes, enrichi ou non en éthanol et en acides octanoïque et décanoïque. Ces conditions sont celles rencontrées dans le moût ou les milieux en arrêt de fermentation.

MATERIELS ET METHODES

La levure utilisée est une souche de *Sacch. cerevisiae,* levure sèche active produite industriellement (Gist Brocades). A partir d'un milieu de base synthétique (GENEIX et *al.*, 1983) on prépare des milieux de concentrations variables en saccharose (260 g/l ou 20 g/l) supplémentés ou non avec de l'éthanol (8,7 p. 100 w/v), des acides octanoïque (10 mg/l) et décanoïque (3 mg/l) (milieu A, B_1, B_2, B_3, tableau I). Ces milieux sont stérilisés par filtration sur membrane 0,45 µm et répartis en flacons stériles, bouchés d'un dispositif qui assure une semi-aérobiose et mis à fermenter à 25° C.

Les cellules viables sont dénombrées sur milieu nutritif solide (GENEIX et *al.*, 1983). Le saccharose et les produits de son hydrolyse sont dosés par méthode enzymatique (BERMEYER, 1974 b).

Pour préparer les extraits acellulaires, on récolte environ 2×10^7 cellules vivantes par centrifugation, 5 minutes à 9000 g, à 4° C. Les cellules sont lavées et suspendues dans du tampon phosphaté 0,07 M, pH 7,4, contenant du dithiotréitol. Elles sont broyées au Vortex en présence de billes de verre (diamètre 0,5 mm) par période d'agitation de 30 secondes, suivie d'un refroidissement dans la glace.

Du tampon phosphaté est ajouté au broyat et le mélange est centrifugé 5 minutes à 9800 g. On recueille le surnageant dans lequel sont mesurées les activités HK (EC 2.7.1.1.) et ADH (EC 1.1.1.1) (BERMEYER, 1974 a). Les activités spécifiques sont exprimées en unités/mg (U/mg) de protéine. La teneur en protéine de l'extrait est déterminée par la méthode Lowry (LOWRY et *al.*, 1951).

TABLEAU I

Evolution des populations viables et des activités fermentaires de *Sacch. Cerevisiae* en fonction de la richesse en sucre et de la présence éventuelle d'éthanol et d'acides octanoïque et décanoïque

Milieux	Composition du milieu			Déterminations	Evolution en fonction du temps (en jours)							
	Saccharose (g/l)	Ethanol (%)	Acides (mg/l)		1	2	3	6	10	16	23	29
A	260	0	0	Cellules viables (1)	18	49	51	34	16	10	7,5	4,5
				Sucre fermenté (2)	24	52	96	165	199	220	230	232
				Activité hexokinase (3)	1.1	1.2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	0,9
				Activité alcool-déshydrogénase (3)	0.6	1,5	1.1	1,0	0,9	0.7	0,6	0,3
B1	20	0	0	Cellules viables (1)	20	34						
				Sucre fermenté (2)	15.5	20						
				Activité hexokinase (3)	2,3	1.6						
				Activité alcool-déshydrogénase (3)	1.9	2,1						
B2	20	11	0	Cellules viables (1)	2.3		4,8	12	9			
				Sucre fermenté (2)	2.0		7	17	20			
				Activité hexokinase (3)	0.8		1,7	2,1	1,8			
				Activité alcool-déshydrogénase (3)	2.0		2,7	2,7	2,0			
B3	20	11	octanoïque (10) décanoïque (3)	Cellules viables (1)	1,0		1,5	1,5	3,0	3,0		
				Sucre fermenté (2)	0		0	4	10	20		
				Activité hexokinase (3)	0,8		0,8	1,2	1,0-	1,0		
				Activité alcool-déshydrogénase (3)	2,2		3,1	4,9	4,5	3,5		

(1) : x 10^6 cellules par millilitre
(2) g par litre
(3) Unité par mg de protéine.

RESULTATS

Dans le milieu A, riche en sucre, initialement dépourvu d'éthanol et d'acides gras, la population levurienne maximale atteint 5,1 x 10^7 cell./ml au 3e jour (tableau I). La fermentation s'arrête spontanément après 29 jours laissant 28 g/l de sucre non dégradé. L'activité HK dans les extraits acellulaires varie peu au cours de la fermentation ; par contre, celle de ADH passe par un maximum en fin de phase de prolifération (tableau I). A l'arrêt prématuré de la fermentation, les activités sont toujours appréciables ; elles représentent respectivement 0,8 U/mg de protéine et 0,3 U/mg de protéine pour l'une et l'autre enzyme. Cet arrêt n'est donc pas lié à l'inhibition totale de ces deux enzymes-clefs de la dégradation des hexoses.

On remarque également que ces mêmes activités sont plus élevées en milieu pauvre en sucre (tableau I). Ce résultat suggère une inhibition de ces enzymes par une forte concentration en sucre alors que, pour des populations levuriennens viables équivalentes en nombre, la quantité d'hexoses dégradée, pendant le premier jour, est plus forte.

Dans le milieu alcoolisé B_2, comparativement en milieu B_1, la population maximale est trois fois moins importante et la durée de la fermentation cinq fois plus longue (tableau I). Mais, contrairement à ce que cette inhibition pourrait laisser supposer, l'activité maximale de HK se trouve peu modifiée dans sa valeur bien qu'elle soit atteinte après un plus long délai. En outre, l'inhibition de fermentation est accompagnée d'une activité de l'ADH sensiblement accrue (tableau I).

Lorsque à la présence d'acides gras s'ajoute celle de l'éthanol (milieu B_3), la population levurienne viable n'augmente pas et demeure quasi stationnaire (tableau I) ; la fermentation est prolongée de 6 jours par rapport à B_2. L'activité maximale de l'HK est sensiblement diminuée ; surtout, celle de l'ADH est fortement stimulée, avant même toute dégradation du sucre (tableau I).

CONCLUSION

Ces résultats apportent des informations nouvelles concernant la relation entre les activités enzymatiques et l'inhibition du métabolisme de *Sacch. cerevisiae* en vinification. Ils montrent que ce phénomène ne découle pas de la perte totale d'activité des systèmes impliqués dans la dégradation du sucre. Tout au contraire, en présence d'inhibiteurs, on observe une augmentation importante de l'activité ADH.

Manuscrit reçu le 10 juillet 1984 ; accepté pour publication le 26 septembre 1984.

RÉSUMÉ

L'inhibition des activités hexokinase et alcool-déshydrogénase de *Sacch. cerevisiae* n'est pas la cause de l'arrêt de la fermentation dans les milieux riches en

sucre (moût de raisin). Chez les levures cultivées en présence de certains inhibiteurs de la fermentation (éthanol, acides octanoïque et décanoïque) l'activité alcool-déshydrogénase est même fortement accrue.

SUMMARY

The arrest of fermentation in medium rich in sugar (grape must) is not related to the inhibition of hexokinase and alcohol-dehydrogenase activities of *Sacch. cerevisiae.* when yeast are grown in the presence of some inhibitory factors (ethanol, octanoic and decanoic acids), the alcohol-dehydrogenase activity is strongly increased.

ZUSAMMENFASSUNG

Der WirkungsnachlaB der Hexokinase und Alkohol-Dehydrase « *Sacch. cerevisiae* » verursacht nicht das Stoppen der Gärung in den Bereichen mit starkem Zuckergehalt (Weinmost). Bei Kulturhefe, in der bestimmte Gärungs-Hemmfaktoren (Athanol, Octyl-oder Dectyl-Säure) vorhanden sind, wird die Wirkung der Alkohol-Dehydrase sogar noch stark erhöht.

RESUMEN

La inhibición de las actividades hexoquinasa y alcohol deshidrogenasa en *Sacch. cerevisiae* no es la responsable de la detención de una fermentación en medios ricos en azucar (moste de uva). En levaduras cultivadas en presencia de algunos inhibidores de fermentación (etanol, ácidos octanóico) la actividad alcohol-deshidrogenasa se presenta, por el contrario, fuertemente aumentada.

RIASSUNTO

L'inibizione delle attività « hexokinase » e alcole desidrogenasi di *Sacch. cerevisiae* non é la causa della sosta di fermentazione negli ambienti ricchi in zucchero (mosto d'uva). Nei lieviti coltivati in presenza di certi inibitori della fermentazione (etanolo, acidi ottanoici e decanoici) l'attività alcole desidrogenasi é anche fortemente aumentata.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERMEYER H.U., 1974. Methods of enzymatic analysis. *Acad. Press, New-York,* **1**, 429-475 (a).

BERMEYER H.U., 1974. Methods of enzymatic analysis. *Acad. Press, New-York,* **1** 1176-1179 (b).

DEMEL R.A. et de KRUYFF B., 1976. The function of sterols in membranes. *Biochem. Biophys. Acta,* **457**, 109-132.

ELTAYEB Y. et BERRY D.R., 1982. Studies on levels of isoenzymes of alcohol dehydrogenase during growth and sporulation of *Saccharomyces cerevisae. Trans. Br. Mycol. Soc.,* **79** (2), 247-251.

ETIAN K.D., 1980. Genetic and biochemical evidence for hexokinase P II as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Molec, Gen. Genet.,* **178**, 633-637.

GENEIX G., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBEREAU-GAYON P., 1983. Effet des acides gras sur la viabilité des populations de *Saccharomyces cerevisiae*. *C.R. Acad. Sc.* **296** (19), Série III, 943-947.

GUPTA I., JAIN V.K. et MISHRA R.K., 1981. Studies on the effects of 2 deoxy-D-glucose on glucose uptake and glycolysis in respiratory-deficient yeast cells. *Indian J. Experimental Biology.*, **19**, 231-237.

LAFON-LAFOURCADE S., 1983. Wine and Brandy, in biotechnology, Tome V. Rhem and G. Reed ed., Verlag chimie Weinhem. R.F.A.

LARUE F., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBEREAU-GAYON P., 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environm. Microbiol.*, **39**, (4) 808-811.

LARUE F., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBEREAU-GAYON P., 1982. Inhibition de *Saccharomyces cerevisiae* dans le moût de raisin. *C.R. Acad. Sc.* **294**, Série III, 587-590.

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDAL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.

NAVARRO J.M. et FINCK J.D., 1982. Evolution de l'activité « hexokinase » de *Saccharomyces uvarum* fermentant le saccharose. Cellular molecular biology, (1), 85-89.

SINGH R. et KUNKEE R., 1976. Alcohol dehydrogenase activities of wine yeasts in relation to higher alcohol formation. *Appl. Environm. Microbiol.*, **32** (5), 666-670.

SINGH R. et KUNKEE R., 1977. Multiplicity and control of alcohol dehydrogenase isoenzymes in variations strains of wine yeasts. *Arch. Microbiol.* **114**, 255-259.

SLONIMSKI P.P., 1955. Adaptation respiratoire : développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. Proc. 3rd inter. Cong. Biochem. Bruxelles. *Acad. Press, New-York,* 242-247.

TRAVERSO-RUEDA S., 1980. A quantification of the stimulatory effect of sterols on the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* under vinification conditions. PH. D. thesis, University of California, Davis.