Connaissance Vigne Vin, 1984, **18**, N° 3, 155-163

PREMIÈRES OBSERVATIONS SUR LE MODE D'ACTION DES ÉCORCES DE LEVURE

Françoise LARUE, Catherine GENEIX, Suzanne LAFON-LAFOURCADE, A. BERTRAND et P. RIBÉREAU-GAYON

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

INTRODUCTION

Des travaux antérieurs (GENEIX et *al.*, 1983 b ; LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1984) ont montré l'efficacité des écorces de levure pour activer la fermentation alcoolique en vinification. Cette découverte repose sur la mise en évidence du rôle de certains acides gras et de leurs esters dans l'inhibition de la levure.

Dans un milieu nutritif complet, riche en sucre, tel que le moût de raisin, le cycle de croissance de *S. cerevisiae* comporte une phase de déclin prolongée (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1979) ; elle s'accompagne d'une activité fermentaire réduite et peut déboucher sur l'arrêt prématuré de la fermentation. Cet arrêt n'est pas dû à des déficiences nutritionnelles, mais à la formation par la levure de substances toxiques qui ajoutent leurs effets à ceux de l'éthanol (GENEIX et *al.*, 1983 a). Parmi ces substances ont été identifiés l'acide octanoïque et surtout l'acide décanoïque ; des essais ultérieurs ont également montré l'action inhibitrice de l'acide dodécanoïque ; ils agissent préférentiellement à l'état libre, mais ils possèdent aussi un certain effet sous forme d'esters éthyliques. Tous ces corps sont présents dans les vins à la dose de quelques milligrammes par litre, concentration à laquelle ils sont actifs sur la levure.

Il semblait a priori évident que l'élimination, même partielle, de ces substances devrait permettre l'accélération de la fermentation. Ce mécanisme explique l'efficacité de l'addition de charbon pour relancer une fermentation arrêtée. Par ailleurs, nous avons montré (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1984) que, dans un milieu calme, les enveloppes cellulaires (ou « écorces ») de levure obtenues après élimination du cytoplasme, adsorbent préférentiellement les esters, mais aussi les acides, surtout l'acide décanoïque dont l'action inhibitrice est la plus forte. L'addition d'écorces au moût de raisin fonctionne comme facteur de survie (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1977) ; elle permet la fermentation d'une plus

grande quantité de sucre. Ce matériau constitue l'activateur de la fermentation le plus performant actuellement connu.

Mais ce traitement agissant sur les acides gras et leurs esters, on pouvait craindre une incidence sur les arômes secondaires de fermentation dans lesquels ces composés jouent un rôle important. Des premières analyses (GENEIX et *al.*, 1983 b) indiquaient, en fin de fermentation, des modifications peu sensibles de la teneur des vins en acides gras et en esters éthyliques. D'ailleurs, on n'a jamais noté de modifications significatives des caractères aromatiques en présence d'écorces de levure. Il importait donc d'étudier leur mode d'action, pour expliquer comment elles peuvent accélérer l'activité des levures, par piégeage de certaines substances au cours de la fermentation, sans modifications appréciables de la constitution du vin.

Ce travail se propose de suivre, au cours de la croissance d'une population de *S. cerevisiae* dans le moût de raisin, l'évolution des acides hexanoïque, octanoïque, décanoïque, dodécanoïque et de leurs esters éthyliques en distinguant la fraction localisée à l'intérieur de la cellule, celle à sa surface et celle excrétée dans le milieu. Une telle étude doit permettre de préciser les modifications entraînées par la présence d'écorces de levure dans le milieu.

MATERIELS ET METHODES

I. — METHODES MICROBIOLOGIQUES :

Le moût de raisin (Muscat, Salins du Midi, 34063 Montpellier) pH 3,5 est enrichi à 220 g de sucre par litre par addition de saccharose.

La levure est une souche commerciale de *S. cerevisiae* (levure sèche active, Gist-brocades, 59472 Seclin)

Les fermentations sont conduites dans des flacons de 750 ml contenant 500 ml de milieu, à 25° C, en semi-aérobiose.

Les écorces de levure proviennent d'une préparation industrielle (Fould-Springer, 94707 Maisons Alfort).

Les populations totales sont dénombrées au compte globule Malassez. Les populations vivantes sont déterminées par numération des colonies formées en milieu nutritif solide (moût de raisin pH 3,5 ; sucre 180 g/l, dilué 2 fois et additionné de 20 g/l de gélose).

II. — METHODES CHIMIQUES :

Les sucres sont dosés par méthode enzymatique (BERGMEYER, 1974).

Les acides gras et leurs esters sont dosés dans le moût par chromatographie en phase gazeuse (BERTRAND, 1975 ; TORRES-ALEGRE, 1982 ; BONNAMOUR-ZMIROU, 1984). Leur dosage dans la cellule de levure a nécessité la mise au point d'une technique d'extraction.

III. — EXTRACTION DES ACIDES GRAS LIBRES ET DES ESTERS ETHYLIQUES CELLULAIRES :

On opère sur un volume de moût en fermentation contenant 10^8 cellules totales. Les levures sont recueillies par centrifugation. Le culot lavé est additionné des étalons internes nécessaires aux dosages chromatographiques ultérieurs, acide heptanoïque et octanol-2. Le mélange est extrait par 0,1 ml d'éther à 5 reprises. 1 µl de l'extrait est injecté dans le chromatographe pour doser les constituants pariétaux.

Le culot de levure, ayant déjà servi au dosage des constituants pariétaux, est additionné des deux étalons internes. Les cellules sont broyées au Vortex en présence de billes de verre. Le broyat est additionné de 0,1 ml d'éther à 5 reprises. 1 µl du solvant est injecté dans le chromatographe pour le dosage des composés endocellulaires.

Dans le cas de fermentations en présence d'écorces, celles-ci sont éliminées au préalable par une centrifugation de 1 mn à 5400 g pendant les phases de prolifération et stationnaire, et de 2 mn à 2000 g pendant la phase de déclin. On vérifie par observation microscopique que le surnageant ne contient pas d'écorces. Une partie de la population levurienne est entraînée dans le culot avec les écorces. On calcule le volume à soumettre à l'extraction de telle sorte qu'il contienne 10^8 cellules totales.

TABLEAU I

Incidence d'une addition d'écorces de levure (0,2 g/l) au 2e jour de la fermentation à l'égard de la croissance des levures et de leur activité fermentaire

Levure : **S. cerevisiae ;** population initiale : 10^6 cellules par millilitre ;
Sucre : 220 g par litre ;
Température : 25 °C.

		Temps				
		25 h	52 h	3 j.	6 j.	13 j.
Témoin	cellules totales	27	70	73	80	80
	cellules viables	27	70	70	48	36
	cellules bourgeonnantes . .	39	14	14	12	5
	sucres résiduels (g/l) . . .	210	158	122	56,0	5,6
+ écorces de levure (0,2 g/l)	cellules totales		72	82	100	110
	cellules viables		72	82	73	59
	cellules bourgeonnantes . .		18	22	15	5
	sucres résiduels (g/l) . . .		156	115	37,5	1,9

Le nombre des cellules totales et viables est donné par millilitre × 10^6.
Le nombre de cellules bourgeonnantes est donné en pourcentage des cellules totales.

RESULTATS

L'addition d'écorces de levure au moût après 48 heures entraîne une certaine augmentation de la population totale, mais surtout le prolongement

TABLEAU II

Evolution des acides hexanoïque, octanoïque, décanoïque et dodécanoïque au niveau des cellules et dans le moût de raisin au cours de la fermentation alcoolique en présence ou non d'écorces de levure

			Temps (jours)			
			1	3	6	13
Acide hexanoïque	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	traces	traces	traces
		+ écorces	traces	traces	traces	traces
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	traces	traces	traces
		+ écorces	traces	traces	traces	traces
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	0,16	1,75	1,68	1,80
		+ écorces	0,16	1,72	1,66	1,60
Acide octanoïque	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	0,37	0	0	0
		+ écorces	0,37	0	0	0
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	0,43	0,45	0,30	0,36
		+ écorces	0,43	0,21	0	0
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	1,36	4,70	4,71	4,01
		+ écorces	1,36	4,31	4,36	3,70
Acide décanoïque	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	1,76	1,28	0,91	0
		+ écorces	1,76	0,74	0,78	0
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	0,96	2,15	2,07	1,06
		+ écorces	0,96	1,19	0,54	0,67
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	0,64	3,07	4,22	2,45
		+ écorces	0,64	2,44	3,78	2,02
Acide dodécanoïque	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	0,89	1,14	0,89	0,91
		+ écorces	0,89	0,99	0,74	0,75
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	1,10	1,62	1,74	0,48
		+ écorces	1,10	1,26	0,56	0,27
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	0,28	0,38	0,27	0,11
		+ écorces	0,28	0,27	0,22	0,09

L'addition d'écorces de levure (0,2 g/l) est effectuée après 48 h d'incubation.

de la phase quasi stationnaire. Pendant la phase de déclin, le taux de viabilité demeure plus important ; la totalité du sucre est fermentée (tableau I). Ces résultats confirment des observations antérieures (GENEIX et *al.*, 1983 b).

I. — EVOLUTION DES ACIDES HEXANOIQUE, OCTANOIQUE, DECANOIQUE ET DODECANOIQUE AU COURS DE LA FERMENTATION DU MOUT DE RAISIN ADDITIONNE OU NON D'ECORCES DE LEVURE.

La levure en croissance dans le moût de raisin ne contient pas d'acide hexanoïque libre. Les acides octanoïque et décanoïque libres endocellulaires s'accumulent pendant les premières heures de la prolifération (tableau II) ; l'acide octanoïque endocellulaire disparaît dès le troisième jour. La teneur en acide décanoïque diminue plus lentement ; elle est nulle en fin de fermentation. Par contre, la teneur en acide dodécanoïque demeure pratiquement constante tout au long de la fermentation.

A la surface de la cellule, les valeurs maximales en ces trois derniers acides sont atteintes plus tardivement, au début de la phase quasi stationnaire, après 3 jours (tableau II). Elles diminuent ensuite en restant toujours plus élevées que les teneurs endocellulaires ; ces trois acides subsistent sur les enveloppes jusqu'à la fin de la fermentation.

Dans le moût de raisin, au cours de la fermentation, les teneurs en acides hexanoïque, octanoïque, décanoïque et dodécanoïque passent par un maximum aux environs du sixième jour, elles restent relativement importantes en fin de fermentation.

Lorsque la fermentation se déroule en présence de 0,2 g d'écorces de levure par litre, les concentrations endocellulaires en acide octanoïque, décanoïque et dodécanoïque sont diminuées (tableau II). L'acide octanoïque pariétal disparait au sixième jour. Entre le troisième et le treizième jour, la fraction pariétale des acides décanoïque et dodécanoïque est nettement inférieure à sa valeur chez les levures dans le moût en l'absence d'écorces de levure.

Dans le moût en fermentation, l'évolution des acides gras est comparable à celle observée en l'absence d'écorces de levure mais les concentrations sont légèrement inférieures ; les différences s'estompent après le treizième jour.

II. — EVOLUTION DE L'HEXANOATE, DE L'OCTANOATE, DU DECANOATE ET DU DODECANOATE D'ETHYLE AU COURS DE LA FERMENTATION DU MOUT DE RAISIN ADDITIONNE OU NON D'ECORCES DE LEVURE.

La levure en croissance ne contient pas d'hexanoate d'éthyle libre. L'octanoate, le décanoate et le dodécanoate d'éthyle apparaissent chez la levure au troisième jour, en fin de phase de prolifération (tableau III).

TABLEAU III

Evolution de l'hexanoate, de l'octanoate, du décanoate et du dodécanoate d'éthyle au niveau des cellules et dans le moût de raisin au cours de la fermentation alcoolique en présence ou non d'écorces de levure

			Temps (jours)			
			1	3	6	13
Hexanoate d'éthyle	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	traces	traces	traces
		+ écorces	traces	traces	traces	traces
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	traces	traces	traces
		+ écorces	traces	traces	traces	traces
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	0,03	0,40	0,43	0,38
		+ écorces	0,03	0,42	0,47	0,39
Octanoate d'éthyle	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	0,58	0,34	0,25
		+ écorces	traces	0	0	0
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	0	0,23	0,32
		+ écorces	traces	0	0	0,14
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	0,025	0,38	0,59	0,70
		+ écorces	0,025	0,38	0,64	0,67
Décanoate d'éthyle	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	0,29	0,55	1,38
		+ écorces	traces	traces	0,64	1,41
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	0,29	0,75	1,82
		+ écorces	traces	0,27	0,30	1,50
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	0	0,21	0,49	0,42
		+ écorces	0	0,17	0,43	0,41
Dodécanoate d'éthyle	- endocellulaire ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	0,69	1,32	1,90
		+ écorces	traces	0,98	1,54	1,30
	- pariétal ($\mu g/10^8$ cellules)	Témoin	traces	0,29	0,24	0,49
		+ écorces	traces	0,25	0,17	0,40
	- dans le moût (mg/l)	Témoin	0,06	0,14	0,21	0,08
		+ écorces	0,06	0,10	0,11	0,07

L'addition d'écorces de levure (0,2 g/l) est effectuée après 48 h d'incubation.

Les cellules s'enrichissent en décanoate et dodécanoate jusqu'en fin de cycle de croissance.

Dans le moût de raisin la teneur en octanoate augmente continuellement ; les autres esters atteignent un maximum au sixième jour.

En présence d'écorces de levure, la cellule est moins riche en octanoate endocellulaire et pariétal. Sa teneur en décanoate et dodécanoate pariétaux est plus faible ; le décanoate et le dodécanoate endocellulaires sont plutôt plus élevés. Mais surtout, dans le moût additionné d'écorces, tout au long de la fermentation, les teneurs en esters éthyliques de ces acides demeurent pratiquement identiques à celles du moût témoin (tableau III).

DISCUSSION

Ces résultats apportent des informations originales concernant le mode d'action des écorces de levure. Ils précisent l'évolution des teneurs en acides hexanoïque, octanoïque, décanoïque et dodécanoïque et en leurs esters éthyliques chez la levure et dans le moût de raisin au cours de la fermentation alcoolique. Ils renseignent sur la localisation de ces substances selon l'état physiologique des populations de levure et l'avancement de la fermentation.

1) Chez les levures en croissance dans le moût de raisin l'acide hexanoïque libre n'existe pas. Par contre, on observe une accumulation des acides octanoïque, décanoïque et dodécanoïque libres endocellulaires au début de la fermentation. Par la suite, les deux premiers sont excrétés dans le milieu et fixés sur les enveloppes de la levure. La fraction endocellulaire a disparu en fin de fermentation alors que la fraction pariétale reste importante. Soulignons que l'acide dodécanoïque endocellulaire reste pratiquement constant, tandis que la fraction pariétale diminue en fin de fermentation. Les acides du moût passent par un maximum aux environs du sixième jour et diminuent légèrement ensuite.

2)L'addition d'écorces de levure a pour effet, pendant la phase stationnaire et le début de la phase de déclin, de nettoyer littéralement la surface des levures des acides gras gras toxiques qui s'y étaient fixés ; les teneurs endocellulaires sont peu modifiées. Il en découle surtout un maintien prolongé en survie des populations non proliférantes et une stimulation de la fermentation. Ceci suggère que la levure a été libérée de la fraction la plus toxique de ces substances et suppose que l'action inhibitrice de ces acides gras se manifeste essentiellement au niveau des enveloppes cellulaires.

3) Dans un milieu calme, les écorces de levure piègent assez fortement les esters (GENEIX et *al.*, 1983 b). Pourtant, leur addition au moût n'a pratiquement pas d'incidence sur la teneur des levures en décanoate et

peu d'effet sur celle en octanoate et dodécanoate. En ce qui concerne le moût en fermentation, la présence d'écorces de levure n'a pratiquement aucune incidence sur la teneur en esters. Il faut donc supposer que certains phénomènes compensent les esters fixés par les écorces de levure. Il peut s'agir d'une formation accélérée ou d'une estérification des acides pour respecter certains équilibres. En réalité, les dosages rendent compte d'un double phénomène qui se compensent, excrétion par les levures et adsorption par les écorces de levure. Tout se passe comme si l'élimination des substances contenues dans le milieu permettrait à la levure d'en excréter davantage. Ce résultat est particulièrement important dans le cas de ces produits dont on connaît le rôle dans l'arôme des vins blancs.

Ces observations présentent un intérêt pratique évident. Elles expliquent l'action « facteur de survie » des écorces de levure (GENEIX et *al.*, 1983). Elles confirment que l'emploi des écorces de levure, en prévention, à dose convenable, ne modifie pas de manière significative la composition des vins en substances volatiles.

Manuscrit reçu le 2 mai 1984 ; accepté pour publication le 6 août 1984.

RÉSUMÉ

Les écorces de levure ajoutées au moût de raisin ont pour effet de limiter l'accumulation endocellulaire et pariétale des acides gras toxiques pour la levure.

Cependant la concentration du moût en acides hexanoïque, octanoïque, décanoïque et dodécanoïque n'est que peu affectée ; celle en esters éthyliques n'est pas modifiée. Ce résultat est particulièrement important dans le cas des vins blancs, car ces substances participent à leurs caractères aromatiques.

SUMMARY

When yeast ghosts are added to grape must they have the effect of limiting endocellular and parietal accumulations of fatty acids toxic to the yeasts. However the concentration of hexanoic, octanoic, decanoic and dodecanoic acids in the must is only slightly affected. The concentration of ethyl esters is unchanged. This result is particularly important for white wines, where these substances contribute to the aromatic characteristics.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zugabe von Heferinden in Traubenmost soll die Anhäufung von toxischen Fettsäuren in den Zellen und an den Zellwänden der Hefe einschränken.

Die Konzentration von hexyl - oktyl - decyl - und dodecylsaüren im Most wird davon nur wening beeinflusst. Dieses Ergebnis ist besonders für die weisseweine wichtig, denn diese Stoffe sind an der Ausbildung der aromatischen Eigenschaften beteiligt.

RESUMEN

La adición al mosto de uva de cortezas celulares de levaduras limita la acumulación endocelular y parietal de ácidos grasos tóxicos para la levadura.

A pesar de ello la concentracion en el mosto de los ácidos hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico es solo afectada ligeramente ; la de sus ésteres etilicos no resulta modificada. Este resultado es especialmente importante en el caso de los vinos blancos, ya que estas substancias participan en sus caráteres aromáticos.

RIASSUNTO

Le scorze di lievito aggiunte nel mosto d'uva hanno per effetto di limitare il cumulo endocellulare e parietale degli acidi grassi tossici per il lievito.

Tuttavia la concentrazione del mosto in acidi grassi séstanoici, ottanoici, decanoici è dodicèsimanoici è poco affettata ; quella in esteri etilici non è modificata. Questo risultato è particolarmente importante nel caso dei vini bianchi, perche queste sostanze fanno parte dei loro caratteri aromatici.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND A., 1975. Recherche sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. *Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Bordeaux II.*

BONNAMOUR-ZMIROU C., 1984. Contribution à l'étude des produits secondaires de la fermentation malolactique des vins. *Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université de Bordeaux II.*

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

GENEIX C., LAFON-LAFOURCADE S. et P. RIBEREAU-GAYON, 1983 (b). Les causes, la prévention et le traitement des arrêts de la fermentation alcoolique. *Connaissance Vigne Vin,* **17** N° 3, 205-217.

LAFON-LAFOURCADE S., LARUE F., BRECHOT P. et P. RIBEREAU-GAYON, 1977. Les stéroïdes « facteur de survie » des levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *C.R. Acad. Sc. Paris, 284 série D, 1939-1941.*

LAFON-LAFOURCADE S., LARUE F. et P. RIBEREAU-GAYON, 1979. Evidence for the existence of « survival factors » as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *App. Environ. Microbiol.,* **38**, N° 6, 1069-1073.

LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C. et P. RIBEREAU-GAYON, 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts. Their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, n° 6, 1246-1249.

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