Connaissance Vigne Vin, 1983, **17**, N° 1, 43-53.

DÉSACIDIFICATION BIOLOGIQUE DES VINS BLANCS SECS PAR FERMENTATION DE L'ACIDE MALIQUE PAR LES LEVURES

E. CARRE, Suzanne LAFON-LAFOURCADE et A. BERTRAND

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

INTRODUCTION

La désacidification biologique des vins blancs secs est recherchée pour répondre à la demande du consommateur qui exige des produits d'acidité faible.

La fermentation de l'acide malique par les levures ou fermentation maloalcoolique constitue, à côté de la fermentation malolactique bactérienne, une deuxième voie de désacidification biologique des vins. Les levures *Saccharomyces* fermentent l'acide malique, mais le phénomène, variable selon les souches (FUCK et RADLER, 1972), demeure toujours restreint. Les levures *Schizosaccharomyces* peuvent dégrader la totalité de cet acide contenu dans le moût. Cependant, leur emploi est limité par l'incidence défavorable des produits de leur méthabolisme sur la composition des vins (DITTRICH, 1963 ; PEYNAUD et LAFON-LAFOURCADE, 1966 ; PARFAIT et JOURET, 1975). En outre, dans les conditions de pH habituellement rencontrées, la transformation complète de l'acide malique conduit à des vins « plats », déséquilibrés (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975).

La stabilité biologique des vins blancs est assurée par leur teneur en anhydride sulfureux libre. Dans ces conditions, une dégradation, même partielle, de l'acide malique demeure techniquement intéressante. Dans un travail récent, VEZINHET et BARRE (1982) mesurant l'intérêt de la fermentation maloalcoolique ont cherché les facteurs susceptibles de l'activer et de la rendre plus complète ; une source azotée minérale, une carence partielle en biotine la favorisent ; toutefois les auteurs soulignent les difficultés que l'on rencontre à la stimuler dans les conditions de la pratique.

Dans le cadre d'une étude de la désacidification biologique des vins blancs secs du Bordelais, nous avons recherché parmi les *Saccharomyces* commercialisés sous forme de levures sèches actives (LSA) les souches les plus désacidifiantes et les modalités d'utilisation susceptibles d'augmenter leur action dans le moût de raisin.

D'autre part, afin de diminuer l'incidence du développement de *Schizosaccharomyces* sur les caractères organoleptiques les vins, on a inoculé cette levure dans le moût en fin de fermentation et dans le vin. Nos observations apportent des éléments nouveaux susceptibles de contribuer à une meilleure maîtrise du problème de la désacidification par les levures, des moûts et des vins.

MATERIELS ET METHODES

Levures

Cinq préparations de levures sèches actives de diverses provenances ont été expérimentées ; elles sont constituées respectivement de *S. cerevisiae* C 1, C 2, de *S. bayanus* B 1, B 2 et de *Schizosaccharomyces pombe.*

Milieux

Moût de raisin (Muscat du commerce, commercialisé en bouteilles) titrant 170 g de sucre par litre, pH 3,3 ; le vin est obtenu par fermentation alcoolique de ce moût par *S. cerevisiae.*

Techniques analytiques

On dose les acides malique et pyruvique, l'acétaldéhyde et le glycérol par méthode enzymatique (BERGMEYER,, 1971) ; les sucres réducteurs par dosage chimique (RIBÉREAU-GAYON et *al.,* 1972) ; les substances volatiles par chromatographie en phase gazeuse (BERTRAND, 1975).

Les fermentations sont conduites en bouteilles de 750 ml contenant 500 ml de moût de raisin stérilisé par filtration. Les flacons sont bouchés par un bouchon de caoutchouc percé d'un tube de verre effilé ; ce dispositif assure une semi-anaérobiose. L'incubation se fait à 19 °C.

RESULTATS

I. — DEGRADATION DE L'ACIDE MALIQUE PAR DIVERSES PREPARATIONS INDUSTRIELLES DE *SACCHAROMYCES* (LSA). INCIDENCE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE L'INOCULUM ET DE LA SUPPLEMENTATION DU MOUT EN THIAMINE.

La fermentation de l'acide malique par les levures passe obligatoirement par la formation intermédiaire de l'acide pyruvique, lequel est décarboxylé et réduit en éthanol (TEMPERLI et *al.,* 1965 ; FLESH et HOLBACH, 1970). On peut supposer que tout facteur activant ce phénomène est susceptible de favoriser la dégradation de l'acide malique. C'est pourquoi, nous avons expérimenté l'incidence de la supplémentation du moût en thiamine, constituant de la TPP (thiamine-pyrophaste), coenzyme de la carboxylase qui catalyse, avec l'alcool-deshydrogénase, la transformation de l'acide pyruvique en éthanol.

Le moût de raisin, additionné ou non de chlorhydrate de thiamine (0,5 mg par litre) est ensemencé à raison de 10^6 cellules par ml avec, respectivement *S. cerevisiae* C 1, C 2 et *S. bayanus* B 1, B 2 (levures sèches actives) : a) après réhydratation selon les indications du fabricant ; b) après 4 jours de culture, à 19 °C, dans le moût. Après une quinzaine de jours d'incubation à 19 °C la fermentation alcoolique est terminée. La quantité d'acide malique dégradé varie d'un échantillon à l'autre (Tableau I).

TABLEAU I

Dégradation de l'acide malique par *Saccharomyces*

Quantité d'acide malique dégradé (g par litre)
Température : 19 °C ;
Sucre inital : 170 g par litre ;
pH : 3.3 ;
Acide malique initial : 4,6 g par litre.

	Après réhydratation		Après 4 jours de culture	
	Témoin	+ chlorhydrate de thiamine	Témoin	+ chlorydrate de thiamine
S. cerevisiae C_1	0,5	0,9	0,9	1,1
C_2	0,7	1,3	0,9	1,0
S. bayanus B_1	1,0	1,2	1,0	0,8
B_2	1,1	2,4	1,2	0,7

Inoculées après réhydratation, *S. bayanus* dégrade 21,7 et 23,9 p. 100 de l'acide malique initial, *S. cerevisiae* 11,5 et 15,2 p. 100. L'inoculation de levures en phase de prolifération ne modifie pas l'activité de *S. bayanus* alors qu'elle augmente respectivement de 69 et de 28 p. 100 celle de *S. cerevisiae* C 1 et C 2.

L'incidence de la supplémentation du moût en chlorhydrate de thiamine varie selon l'espèce et l'état physiologique de l'inoculum. Dans tous les cas d'un ensemencement sous forme réhydraté on observe une nette stimulation de la dégradation de l'acide malique ; notamment, la levure *S. bayanus* B 2 fermente dans ce cas 52 p. 100 de l'acide malique initial. Par contre, dans le cas où l'inoculum est constitué de levures en phase

fermentaire, l'action de la thiamine est faible sur *S. cerevisiae,* elle inhibe le métabolisme de l'acide malique par *S. bayanus.*

II. — DEGRADATION DE L'ACIDE MALIQUE PAR INOCULATION DE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* DANS LE MOUT EN FIN DE FERMENTATION ALCOOLIQUE ET DANS LE VIN.

La dégradation de l'acide malique peut être le fait de biomasses non proliférantes de *Schizosaccharomyces pombe ;* une méthode de dosage microbiologique de cet acide a été basée sur ce principe (PEYNAUD et LAFON-LAFOURCADE, 1964).

TABLEAU II

Dégradation de l'acide malique par *Schizosaccharomyces* inoculé en fin de fermentation alcoolique

	pH	Température	Taux d'ensemencement (cellules/ml)	Acide malique fermenté (g/l) 15 jours * après F.A.	30 jours * après F.A.
Moût en fin de fermentation alcoolique	3,2	18°C	5×10^6	4,74	
		26°C	2×10^6	4,53	
			5×10^6	4,77	
Vin	3,0	18°C		Temps d'incubation 15 jours	30 jours
			2×10^6	-	0,08
			5×10^6	-	0,52
		26°C	2×10^6	-	0,04
			5×10^6	-	0,16
	3,2	18°C	2×10^6	-	3,10
			5×10^6	-	3,10
		26°C	2×10^6	-	2,74
			5×10^6	-	3,11

F.A. * : Fermentation alcoolique
— : pas de dégradation de l'acide malique

Dans un premier essai *Schizosaccharomyces pombe* (LSA) après réhydratation est ajoutée au vin à la dose de 0,5 et 1 g par litre (soit 10^7 et

5 x 10^7 cellules par ml). Après plusieurs jours d'incubation à 18 ° et 26 °C, l'acide malique n'est pas dégradé.

Dans un autre essai, les levures sèches sont préalablement mises à incuber dans dix fois leur volume de moût, pendant 24 h, à 25 °C. On utilise les cellules ainsi réactivées pour inoculer : a) le moût (sucre initial 190 g par litre) en fin de fermentation, contenant 32 g de sucre résiduel par litre ; b) un vin titrant 11,25 p. 100 d'éthanol amené à pH 3,2 (Tableau II). Les essais sont conduits à 18 et 26 °C avec deux taux d'inoculation 2 x 10^6 et 5 x 10^6 cellules par ml.

Dans le moût en fin de fermentation, aux deux températures et pour les deux taux d'ensemencement, il ne se produit aucune dégradation de l'acide malique pendant la transformation des derniers grammes de sucre ; elle intervient après, et dure 15 jours.

Dans le vin, elle est beaucoup plus lente ; elle s'achève après un mois d'incubation à 25 °C et 18 ° C, à pH 3,2 ; à pH 3 elle est pratiquement inexistante, quelle que soit la température, à peine plus notable pour les forts ensemencements.

III. — INCIDENCE DU METABOLISME DE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* A L'EGARD DE LA TENEUR EN COMPOSES VOLATILS ET DES CARACTERES ORGANOLEPTIQUES DES VINS.

Toutes choses égales, comparativement à *S. cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe* en culture pure produit un vin plus riche en éthanol mais aussi en butanediol-2,3, probablement en partie responsable de la sensation d'amertume (Tableau III). Il contient moins de glycérol mais davantage d'acide pyruvique et d'acétaldéhyde. En ce qui concerne les produits volatils on relève cinq fois moins d'alcools supérieurs ; il en résulte un déséquilibre dans les caractères aromatiques. Alcools et acides gras ayant des précurseurs communs (TORRES ALEGRE, 1982) on trouve également moins d'acides gras à courtes chaînes et d'acides gras à longues chaînes ; ces derniers et leurs esters éthyliques sont considérés comme éléments de qualité ; les acétates d'alcools supérieurs, aux odeurs de banane et de rose, sont pratiquement inexistants. En outre, certaines souches de *Schizosaccharomyces pombe* produisent des quantités relativement importantes d'histamine (2,2 mg par litre) (LAFON-LAFOURCADE, 1975).

A la dégustation, les vins issus de la fermentation de *Schizosaccharomyces pombe* sont jugés « plats, amers, déséquilibrés avec des goûts herbacés ». Les coupages à 10, 20 et 50 p. 100 avec les vins témoins ne conduisent pas à des résultats satisfaisants. Les vins provenant d'une inoculation de *Schizosaccharomyces pombe* en fin de fermentation sont considérés de qualité semblable à celle du témoin, issu de la fermen-

tation de *S. cerevisiae*. Les vins ensemencés après fermentation alcoolique paraissent « oxydés, plats, moins fruités » que le témoin non désacidifié, avec un arôme « peu net, rappelant le rance ».

TABLEAU III

Caractéristique analytique des vins issus de la fermentation d'un même moût ensemencé avec *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces*

Sauf indication contraitre les résultats sont exprimés en mg par litre

	S. cerevisiae	*Schizo-Saccharomyces*
Méthanol	29	31
Ethanol (% volume)	10,30	11,58
Alcools supérieurs (1)	393	83
Hexanol	1,16	1,24
Butanediol-2,3	505	695
Glycérol (g/l)	7,15	5,60
Acide acétique	152	402
Acides gras à courtes chaînes (2)	6,85	4,19
Acides gras à longues chaînes (3)	18,90	13,73
Succinate de diéthyle	11,79	2,76
Acétate d'éthyle	48	28
Acétates d'isoamyle + hexyle + phényl-2 éthyle	5,63	0,87
Esters éthyliques d'acides à longues chaînes (3)	6,41	4,14
Acide pyruvique	103	174
Acétaldéhyde	34	42
Acidité fixe (en g H_2SO_4 par litre)	5,75	2,25
pH	3,2	4,0

(1) Propanol-1 + Méthyl-2 propanol-1 + Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 + Phényl-2 éthanol
(2) Acides propionique + butytrique + isobutyrique + isovalérianique ;
(3) Acide hexanoïque (caproïque) + octanoïque (capylique) + décanoïque (caprique).

DISCUSSION

Une désacidification importante peut résulter de la fermentation maloalcoolique du moût ensemencé avec certaines préparations de levures sèches *Saccharomyces*. L'addition de thiamine, contrairement à la

biotine, outre les avantages déjà connus de cette vitamine en vinification, favorise la fermentation de l'acide malique par les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces bayanus,* lorsque celles-ci sont inoculées sous forme sèche active. On peut ainsi, avec certaines souches, faire fermenter plus de 2 g d'acide malique par litre.

L'interprétation du phénomène reste à préciser. On sait que du fait de la répression catabolique exercée par le glucose dans le moût de raisin, la synthèse des cytochromes est inhibée ; les mitochondries dégénèrent ; l'activité des enzymes du cycle tricarboxylique est extrêmement réduite (SLONIMSKI, 1955 ; TRAVERSO RUEDA, 1980) ; ceci explique l'inefficacité de la biotine.

Dans ces conditions on peut penser que la dégradation de l'acide malique est le fait essentiellement de l'enzyme malique mise en évidence par FUCK et RADLER (1972) chez *S. cerevisiae.* La thiamine n'interviendrait pas directement ; favorisant la décarboxylation de l'acide pyruvique, elle agirait en déplaçant l'équilibre malate → pyruvate. Le besoin en cette vitamine serait plus important lorsque la population d'inoculum est introduite sous forme de levure sèche active.

Quant aux conséquences du métabolisme spécifique de *Schizosaccharomyces,* en première approximation, il s'agirait moins de la formation de quelques substances particulières donnant des « mauvais goûts », que d'une modification dans le rapport des produits volatils formés, moins d'alcools supérieurs et moins d'esters, mais davantage de butanediol-2,3 par exemple. L'effet défavorable est accusé par la désacidification trop importante qui détruit un certain équilibre dans la structure du vin ; il persiste à travers les mélanges avec des vins acides. Pratiquement on retrouve les caractères aromatiques de ceux-ci au moment où leur proportion dans le mélange fait disparaître la « souplesse » que l'on attend de la désacidification biologique.

Pour pallier cet inconvénient, on a cherché à limiter le métabolisme de *Schizosaccharomyces* en introduisant les populations dans le milieu contenant peu ou pas de sucre. Dans ces conditions, les levures sèches nécessitent, pour être efficaces, une réactivation. Une biomasse de *Schizosaccharomyces* non proliférante ajoutée dans le vin, peut fermenter l'acide malique à la condition qu'elle se trouve, au moment de l'inoculation, dans la phase de multiplication. Dans la pratique, il suffit de laisser incuber les levures sèches 24 heures dans dix fois leur volume de moût ; en outre, le vin doit présenter un pH supérieur à 3,0. Toutefois, pendant la durée de la fermentation maloalcoolique, en l'absence d'anhydride sulfureux libre, on observe une oxydation non négligeable du vin.

La modalité la plus convenable pour l'utilisation de *Schizosaccharomyces,* paraît être son inoculation dans le moût en fin de fermentation,

TABLEAU IV

Influence du métabolisme de *Schizosaccharomyces* sur la composition du vin lors d'ensemencements dans le moût en fin de fermentation alcoolique et dans le vin

Sauf indication contraitre les résultats sont exprimés en mg par litre

	Inoculation en fin de fermentation alcoolique					Inoculation dans le vin		
Schizosaccharomyces cellules/ml	0	2×10^6		5×10^6		0	5×10^6	
Température (°C)	18	18	26	18	26	18	18	26
Méthanol	25	28	25	35		26	27	25
Alcools supérieurs (1)	375	377	448	351	412	332	319	327
Hexanol	1,08	0,98	1	0,94	0,99	1,23	1,28	1,4
Glycérol (g/l)	9,4	7,2	7	7,2	7	6,6	6,7	8
Acétate d'éthyle	52	23	33	33	39	47	50	55
Acétates d'isoamyle + hexyle + phényl-2 éthyle	3,28	1,64	1,37	0,99	1,87	2,31	2,02	1,85
Esters éthyliques d'acides gras à longues chaînes (2)	1,05	0,68	0,53	0,50	0,57	1,34	1,10	0,95
Butanediol-2,3	295	303	288	321	396	375	381	465

(1) Propanol-1 + Méthyl-2 propanol-1 + Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 + phényl-2 éthanol
(2) Hexanoate d'éthyle (caproate) + Octanoate d'éthyle (caprylate) + Décanoate d'éthyle (caprate)

le milieu étant alors à l'abri des oxydations ; la fermentation maloalcoolique suit de très près la fermentation alcoolique. L'analyse fait apparaître des modifications dans la composition des vins en composés volatils (Tableau IV), mais celles-ci ne sont pas ressenties défavorablement à la dégustation.

Manuscrit reçu le 24 janvier 1983 ; accepté pour publication le 28 février 1983.

RÉSUMÉ

Une fermentation maloalcoolique notable peut être obtenue par ensemencement des moûts avec certaines des préparations de levures sèches actives commercialisées. L'addition de thiamine peut stimuler le phénomène. L'inoculation de **Schizosaccharomyce pombe** en fin de fermentation alcoolique réduit considérablement l'incidence du métabolisme de cette levure sur les caractères organoleptiques du vin. L'ensemble de ce travail montre qu'une désacidification appréciable des vins peut résulter d'une utilisation judicieuse des levures.

SUMMARY

A considerable malolactic fermentation can be obtained by adding to musts some commercial active dry yeasts. An addition of thiamine may increase this phenomenon. When addition of **Schizosaccharomyces pombe** takes place at the end of alcoholic fermentation conséquences of the metabolism of this yeast strain about organoleptic properties of wine are considerably decreased. With a well-advised utilization of these yeasts it is possible to obtain a considerable deacidification of wines.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine zufriedenstellende maloalkoholische Gärung wurde erreicht, indem man dem most verschiedene Präparate von aktiven Trockenhefen aus dem Handel zusetzte. Der Zusatz von Thiamin stimuliert den Vorgang. Das Einbringen von **Schizosaccharomyces pombe** am Ende der alkoholischen Gärung reduziert den Einfluss des Metabolismus dieser Hefe auf die organoleptischen Gegebenheiten des Weines. Das Ergebnis dieser Arbeiten zeigt, dass eine gewogene Entsäuerung der Weine durch eine gezielte Anwendung dieser Hefe erhalten wird.

RESUMEN

Una fermentación maloalcohólica notable se logra por la siembra de mostos con algunas levaduras secas activas comerciales. La adición de tiamina puede estimular el fenómeno. La inoculación de **Schizosaccharomyces pombe** al final de la fermentación alcohólica reduce considerablemente la incidencia del metabolismo de esa levadura sobre los caracteres organolípticos del vino. Este trabajo muestra que se puede conseguir una desacidificación apreciable de los vinos con una utilización racional de las levaduras.

RIASSUNTO

Una fermentazione maloalcolica notevole può esser ottenuta con seminatura dei mosti con certe preparazioni di lieviti secchi attive commercializzate. L'addizione die tiamina puô stimolare il fenomeno. L'inoculazione die « **Schizosaccha-**

romyces pombe » in fine di fermentazione alcolica ridusce notevolmente l'incidenza del metabolismo di questa lievito sui caratteri organolettici del vino. L'insieme di questo lavoro mostra che una disadificazione notevole dei vini puô esser il risultato di un'utilizzazione intelligente dei lieviti.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGMEYER H.V., 1971. Méthodes d'analyses enzymatiques, 4e éd. Academic Press, London.

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

DITTRICH H.H., 1963. Versuche zum Äppelsäurebbau mit einer Hefe der Gärung. *Schizosaccharomyces. Wein Wissenschaft,* **18**, 392-405.

FÜCK E. et RADLER F., 1972. Äpfelsaürestoff wechsel bei. *Saccharomyces* I. Der anaerobo Apfelsaürestoff bei. *Saccharomyces cerevisiae. Arch. Mikrobiol,* **87**, 149-164.

LAFON-LAFOURCADE S. et PEYNAUD E., 1966. Sur les taux d'acides cétoniques formés au cours de la fermentation alcoolique. *Annales microb., Inst. Pasteur,* **110**, 766-778.

LAFON-LAFOURCADE S., 1975. L'histamine des vins. *Connaissance Vigne Vin,* **9**, N° 2, 103-115.

PARFAIT A. et JOURET C. 1975. Formation des alcools supérieurs dans les rhums. *Ann. Technol. Agric.,* **24**, N° 1, 421-436.

PEYNAUD E. et LAFON-LAFOURCADE S., 1964. Dosage simple de l'acide malique à l'aide de *Schizosaccharomyces pombe. C.R. Acad. Sc.,* Paris, **258**, 5541-5543.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1972. *Sciences et Techniques du Vin,* Tome I ; idem 1975, Tome II.

SLONIMSKI P.P., 1955. Adaptation respiratoire. Proc. Inter. Congr. Biochem. Bruxelles, Acad. Press, New-York, 242-247.

TEMPERLI et *al.*, 1965, FLESH et HOLBACH, 1970, cité par BENDA I. (1982). « Wine and brandy » in *Industrial Microbiology.* Vertag chemie, ed. (Florida).

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

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

VEZINHET F. et BARRE P., 1982. Action de quelques facteurs du milieu sur le métabolisme de l'acide malique par *Saccharomyces* et *Schizosaccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique. *Sci. aliments,* **2**, N° 3, 297-312.