DESACIDIFICATION BIOLOGIQUE DES VINS PAR LES LEVURES DE FLEUR

C. LLAGUNO, M.J. FERNANDEZ, M.D. GARRIDO et J. GARRIDO.
Institut des Fermentations Industrielles
Section d'Œnologie, Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique.
Madrid. Espagne.

INTRODUCTION

L'utilisation par les bactéries ou les levures de certains acides organiques présents dans le vin est un procédé biologique qui offre un grand intérêt pour l'élimination totale ou partielle de certains acides, comme l'acide malique ou l'acide acétique qui, lorsqu'ils se trouvent en grande quantité, sont nuisibles à l'arôme et à la saveur des vins.

Le processus de désacidification bactérienne du vin par la fermentation malolactique est bien connu. Le vin acquiert ainsi une plus grande souplesse au goût et une stabilité biologique indispensable à sa conservation en bouteilles. Cependant, les levures **Schizosaccharomyces pombe** peuvent aussi fermenter l'acide malique (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1962). TARANTOLA et GANDINI, 1967 ont décrit des essais semi-industriels de désacidification biologique d'un moût blanc piémontais provoquée aussi bien par l'ensemencement de bactéries malolactiques que de **Schizosaccharomyces pombe.**

FERNANDEZ et **al.** (1964, 1966) ont décrit la dégradation, par les levures, des acides malique, tartrique, citrique, lactique et succinique et ont étudié avec soin le métabolisme de l'acide tartrique par une souche de **Rhodotorula glutinis** (FERNANDEZ et RUIZ-AMIL, 1965).

La diminution de la teneur des vins en acide acétique par voie biologique est un procédé très intéressant en ce qui concerne leur qualité et leur conservation. La consommation de l'acide acétique par les levures qui forment un voile sur les vins de 14 à 15° d'alcool (levures de « fleur ») a été décrite par SAAVEDRA et GARRIDO (1963) qui ont utilisé des souches de **Saccharomyces cheresiensis.** En maintenant ces levures en cultures stationnaires, ces auteurs ont constaté que le développement du

voile s'obtient d'autant plus rapidement que la concentration en alcool est plus basse ; ils ont déterminé la concentration optimale à 8° d'alcool.

En culture immergée avec des souches de **Saccharomyces cheresiensis,** CABEZUDO (1967) a montré que la température devait être maintenue à 18° C, pour obtenir un développement cellulaire suffisant sur des vins d'un degré alcoolique élevé (14 à 15° d'alcool). Cette température est inférieure à celle qui est considérée comme la plus favorable pour les cultures proliférantes de levures. Nous avons étudié l'influence de la concentration en alcool du vin et de la température de développement des levures de fleur dans les vins riches en éthanol, afin de déterminer les conditions optimales de multiplication rapide des cellules de la souche **S. cheresiensis** (V-24 de la collection de notre Institut) qui entraînent dans le vin une consommation maximale d'acide acétique.

EXPERIMENTATION

Matériel biologique, milieu de culture, dosage de l'acétaldéhyde et étude de la croissance cellulaire, sont décrits dans une publication précédente (LLAGUNO et **al.** 1970).

Technique de culture.

On réalise une culture immergée avec aération et agitation dans des récipients spéciaux en verre ou dans un fermenteur en acier inoxydable d'une capacité de 30 litres (CABEZUDO, 1967). Dans chaque essai figure la température correspondante.

Acidité volatile.

Elle est déterminée au moyen de la méthode décrite par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1962).

RESULTATS

Nous avons essayé de préparer des quantités suffisantes d'inoculum d'une manière rapide et abondante. Pour cela, d'une part, nous avons utilisé comme substrat un vin blanc d'Andalousie occidentale, de 15° d'alcool, additionné soit de glucose (0,05 p. 100) ou de phosphate monopotassique (0,01 p. 100) ou des deux composés simultanément.

D'autre part, afin de diminuer l'effet inhibiteur de l'éthanol, nous avons utilisé le même vin blanc dilué avec de l'eau de façon à amener son titre alcoolique à 7°. Ce vin est également additionné de glucose, de phosphate ou de glucose et phosphate, dans les proportions déjà mentionnées.

Ces essais ont été effectués dans des récipients spéciaux permettant l'aération et l'agitation, d'une capacité de 250 ml et contenant 100 ml de substrat. Les échantillons ont été ensemencés avec une suspension aqueuse d'une culture de **S. cheresiensis,** préalablement développée 48 heures sur milieu gélosé à 2 p. 100 et extrait de malt de 6° Baumé. Ensuite, les cellules sont mises à incuber en culture immergée, avec aération, à 18° C, pendant des périodes déterminées, dont la durée est indiquée dans chaque essai. On mesure la densité optique à 660 nm. Les poids secs des levures (g par l) correspondants à chaque densité optique sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I

Multiplication de la levure S. cheresiensis, **souche V-24, pour l'obtention d'inoculum à 18° C**

Temps de culture (heures)	Vin de 15 degrés additionné de				Vin de 7 degrés additionné de			
	sans addition	glucose	phosphate	glucose + phosphate	sans addition	glucose	phosphate	glucose + phosphate
0	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
24	0,10	0,10	0,10	0,10	0,34	0,38	0,35	0,37
48	0,12	0,13	0,12	0,12	1,55	1,68	1,55	1,66
72	0,15	0,16	0,15	0,15	1,74	2,07	1,67	1,74
96	—	—	—	—	1,80	1,91	1,90	1,91

Le poids sec de levures est exprimé en g par litre.

Les résultats montrent que l'addition de phosphate ou de glucose au vin (avec 15° d'alcool) n'améliore pas sensiblement la vitesse de multiplication de la levure. Dans tous les cas, la croissance est très lente ; après trois jours, la production de levure atteint 0,16 g par litre (poids exprimé en poids sec de levure). Ce résultat semble indiquer que l'absence de substances nutritives dans le vin n'est pas la cause de cette lente multiplication. Au contraire, dans le vin de 7° d'alcool, la

multiplication est, dans tous les cas, beaucoup plus rapide (13 fois plus élevée en 48 heures) et même légèrement plus élevée dans le vin additionné de glucose.

L'examen microscopique des levures cultivées sur vin de 7° d'alcool confirme que, même au début de la phase stationnaire, il n'y a pas un nombre excessif de vieilles cellules; la plus grande quantité de cellules jeunes se trouve dans le milieu contenant du glucose. Dans un travail antérieur (LLAGUNO et **al.** 1970) nous avons montré que la teneur en alcool-déshydrogénase des extraits bruts de cellules ainsi obtenues est la plus favorable pour être utilisée dans le processus de vieillissement accéléré.

Pour utiliser comme inoculum les cellules développées sur vin de 7° d'alcool et 0,05 p. 100 de glucose, le temps d'incubation optimum serait compris entre 30 et 40 heures; à ce moment, les levures se trouvent en pleine phase logarithmique de croissance.

Essais en fermenteur.

Compte-tenu des résultats précédents, nous avons poursuivi l'étude de la préparation d'inoculum à l'échelle semi-industrielle. On utilise un fermenteur de 30 litres (CABEZUDO, 1967) dans les conditions suivantes :

Culture immergée avec aération à 18° C

Agitation 350 tours par minute

Vin blanc dilué avec de l'eau jusqu'à 7° d'alcool additionné de glucose (0,5 p. 100)

Ensemencement par **S. cheresiensis** (0,05 g de poids sec de levure par litre) cultivées pendant 48 heures, sur milieu gélosé.

Les résultats obtenus sont satisfaisants puisque après 32 heures de culture, au moment où la multiplication cellulaire se trouve en pleine phase logarithmique, on obtient 0,32 g de poids sec de levures par litre. Cette quantité est suffisante pour ensemencer largement 18 litres de vin placés dans le fermenteur. Comme le montre l'examen microscopique, les cellules se trouvent dans les meilleures conditions de reproduction.

En conclusion, nous avons décidé que les cellules destinées à l'ensemencement du vin dans le fermenteur seraient préparées dans ces conditions (vin avec 7° d'alcool + 0,05 p. 100 de glucose). On évite ainsi, dans

la préparation de l'inoculum, les difficultés dues à la lente multiplication des levures dans les vins à concentrations élevées en éthanol.

Multiplication cellulaire et consommation d'acidité sur les vins de 11°5 d'alcool.

Les vins d'Andalousie Occidentale ont un degré alcoolique de 11 à 12° à la fin de la fermentation alcoolique; avant le début du processus de vieillissement traditionnel, on porte la teneur en éthanol jusqu'à 14 et 15°.

Compte-tenu de ce fait, on utilise un vin blanc de 11°5 d'éthanol, pour étudier la multiplication cellulaire et la consommation d'acidité volatile. Dans ces conditions, l'inhibition de la croissance par l'éthanol est plus faible; on peut ainsi, parallèlement, étudier l'influence de l'augmentation de la température.

Les premiers essais ont été effectués dans des récipients spéciaux de 350 ml contenant 100 ml de vin de 11°5 d'alcool. Les échantillons sont ensemencés avec une culture de **S. cheresiensis** préalablement cultivée sur un vin de 7° d'alcool additionné de glucose (0,05 p. 100) jusqu'à obtention du poids de la levure indiqué dans chaque essai dans le tableau I; la température d'incubation est de 22° C (tableau II).

TABLEAU II

Influence de la concentration en éthanol sur le développement de S. cheresiensis **en culture immergée.**

Temps de culture (heures)	Vin de 11,5 degrés (culture à 22° C)			Vin de 15 degrés (culture à 18° C)		
	Poids sec (g par l)	Acétaldéhyde (mg par l)	Acidité volatile (g CH_3-COOH par l)	Poids sec (g par l)	Acétaldéhyde (mg par l)	Acidité volatile (g CH_3-COOH par l)
0	0,37	150	0,39	0,38	210	0,47
24	0,53	670	0,19	0,42	460	0,42
48	1,02	1150	0,14	0,47	510	0,37

On compare ces résultats avec ceux obtenus sur le vin de 15° d'alcool traité dans les mêmes conditions, mais dont la température de culture est de 18 ° C (tableau II); cette température est indispensable pour permettre le développement des levures avec des concentrations élevées en éthanol.

Les essais antérieurs montrent que :

— dans le vin de 11°5 d'alcool, les résultats sont très satisfaisants; en 48 heures, à 22° C, on obtient une multiplication cellulaire 3 fois plus forte; sur le vin de 15° d'alcool, elle est seulement de 1 à 1,2 fois plus élevée.

En ce qui concerne la consommation de l'acidité volatile sur le vin de 15° d'alcool, on obtient seulement une consommation de 0,1 g par litre (exprimée en grammes d'acide acétique par litre), alors qu'avec un vin de 11°5 la consommation d'acidité volatile atteint, après 48 heures de traitement, 0,25 g par litre.

Ces résultats confirment qu'un abaissement de la teneur en éthanol permet d'augmenter la température de culture et que la conjugaison de ces deux facteurs a une influence positive sur la multiplication des levures, ainsi que, fait plus important, sur la consommation d'acidité volatile.

Effet de la température de culture sur la consommation de l'acide volatile.

Nous avons étudié l'influence de températures supérieures à 22° C sur un vin de 11°5 d'alcool afin de déterminer la meilleure température de consommation de l'acidité volatile. Plusieurs essais ont été effectués en fermenteur de 30 litres dans les conditions précédemment décrites d'aération et agitation.

L'ensemencement s'effectue au moyen de 0,3 g par litre de levures (exprimé en poids sec de cellules de **S. cheresiensis**) obtenues sur milieu gélosé et développées dans un vin à 7° d'alcool et 0,05 p. 100 de glucose, aux températures indiquées pour chaque essai dans le tableau III.

Les résultats du tableau III et la figure 1 (a et b) confirment nettement que, en abaissant la concentration en éthanol du vin on peut augmenter la température d'incubation de la culture jusqu'à la température optimale du développement cellulaire et la plus forte consommation d'acidité volatile.

La croissance est sensiblement plus élevée lorsqu'on passe de 22° C à 25° C et à 28° C, puisque cela entraîne respectivement une augmenta tion de 68,130 et 162 p. 100 du poids de cellules récoltées. Une augmentation de la température jusqu'à 30° C a un effet négatif ; on obtient seulement une augmentation de poids sec de levure (16 p. 100), quantité sensiblement inférieure à celle obtenue à 22° C. Ce résultat s'explique par

le fait que 30° C est la limite de température tolérée par cette espèce, même en l'absence d'éthanol.

TABLEAU III

Influence de la température sur le développement de S. cheresiensis, **souche V-24, sur vin de 11,5 degrés (culture immergée).**

Température de culture (° C)	Temps de culture (heures)	Ethanol (mg par l)	Acidité volatile (g H_2SO_4 par l)	Poids sec (g par l)
22	0	260	0,29	0,29
	20	900	0,15	0,49
25	0	250	0,30	0,33
	9	530	0,20	0,45
	20	880	0,10	0,76
28	0	240	0,26	0,32
	9	700	0,10	0,48
	20	940	0,00	0,84
30	0	240	0,30	0,32
	9	580	0,24	0,39
	20	780	0,21	0,48

Dans tous les cas, l'accumulation d'éthanol est également très importante; il n'y a donc pas d'inconvénient à ce que l'on élève la température pendant le vieillissement accéléré.

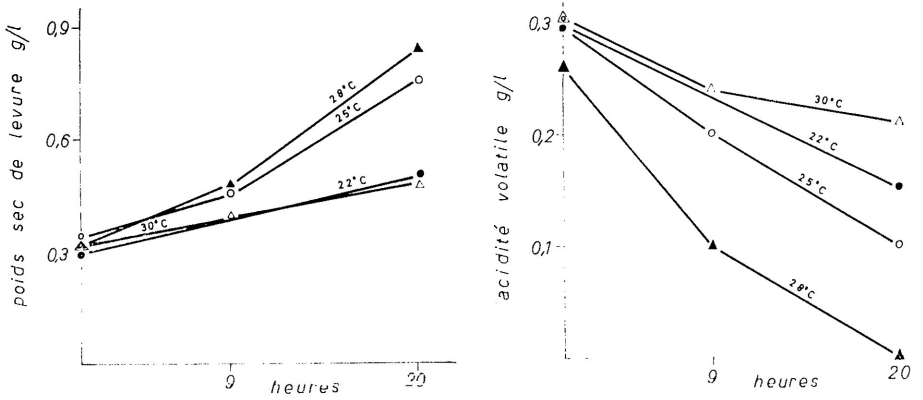


Fig. 1 — Influence de la température :
a) sur la croissance de la levure
b) sur la consommation de l'acidité volatile
Vin blanc de 11 ° 5 d'alcool soumis au processus de vieillissement accéléré.
Saccharomyces cheresiensis, souche V-24.

Parallèlement à l'augmentation de la croissance cellulaire entre 25 et 28° C, les résultats montrent une plus grande consommation d'acidité volatile. La figure 1 (a et b) donne les valeurs de l'essai à 22° C dans lequel, aux valeurs les plus élevées du poids sec de levure correspondent les teneurs les plus basses de l'acidité volatile. Ceci signifie qu'à une plus grande vitesse de multiplication cellulaire correspond une plus grande consommation d'acidité volatile, ou ce qui revient au même, pendant que les cellules se trouvent en phase de développement, elles utilisent mieux la fraction d'acidité volatile du vin; ces deux phénomènes sont plus rapides pour des concentrations alcooliques inférieures (11°5) que pour celles des vins d'Andalousie Occidentale (14 à 15°), qui sont soumis au vieillissement selon le système traditionnel de " soleras ".

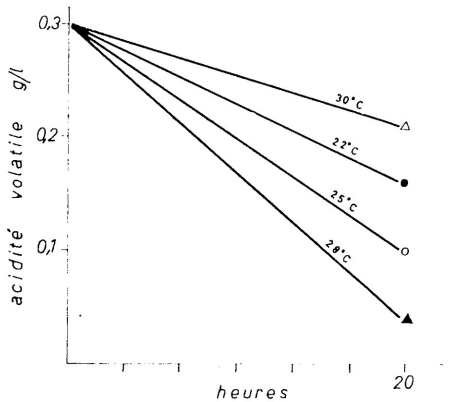


Fig. 2 — Diminution relative de la concentration d'acidité volatile en fonction de la température de culture. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la figure 1.

La diminution relative de la teneur en acidité volatile, pendant 20 heures, correspondant dans le vin à une valeur initiale de 0,3 g d'acidité volatile par litre, est représentée par la figure 2. A la température de 22 ° C, la consommation d'acidité volatile du vin est au total de 0,14 g par litre. Cette consommation augmente avec la température, atteignant 0,26 g par litre quand l'incubation s'effectue à 28° C. Cette température est donc considérée comme la plus favorable pour le vin de 11°5 d'alcool soumis au processus de vieillissement accéléré.

CONCLUSIONS

On peut obtenir une multiplication rapide et abondante de levures de « fleur » **(Saccharomyces cheresiensis,** souche V-24) sur un vin dilué de 7° d'alcool. A des concentrations élevées en éthanol (14 à 15°), il se produit une inhibition partielle du développement de la levure. L'addition de

substances nutritives, telles que le phosphate monopotassique (0,01 p. 100) n'augmente pas la vitesse de multiplication cellulaire, contrairement à l'addition de glucose (0,05 p. 100) qui a un effet légèrement positif.

On a pu résoudre le problème d'ensemencement des fermenteurs pour le processus de vieillissement accéléré, en précisant les conditions d'obtention des levains efficaces, même sur vins à concentrations élevées en éthanol (14°) par examen microscopique et mesure du taux d'alcool-déshydrogénase.

Pour les concentrations en éthanol égales ou inférieures à 11°5, l'inhibition du développement cellulaire est très diminuée ; ceci permet d'augmenter la température d'incubation de 18° C jusqu'à 28° C. A 28° C, on obtient une consommation d'acidité volatile de 0,26 g par litre en 20 heures de culture dans les vins de 11 à 12 ° d'alcool soumis au processus de vieillissement accéléré.

L'accumulation d'acétaldéhyde est également suffisante à 28° et à 22° C. A 22° C, la consommation d'acidité volatile, en 20 heures de culture, est de 0,14 g par litre.

On peut remarquer que les cellules en phase logarithmique de croissance consomment, dans les vins, les plus grandes quantités d'acidité volatile; inversement, les cellules non proliférantes accumulent de plus grandes quantités d'acétaldéhyde que les cellules en développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CABEZUDO M.D. (1967). **Aspectos de la crianza de vinos finos por levaduras de flor.** Thèse de Doctorat. Madrid.

FERNANDEZ M.J., LLAGUNO C., INIGO B. (1964). Metabolismo de levaduras. I. Assimilaciôn de ácidos tartarico y lâctico. **Rev. C. Aplic., 98,** 223.

FERNANDEZ M.J., LLAGUNO C. et INIGO B. (1966). Metabolismo de levaduras. II, Asimilacion de ácidos málico, citrico y succinico. **Rev. C. Aplic. 111,** 315.

FENANDEZ M.J. et RUIZ AMIL M. (1965). Tartaric acid metabolism in **Rhodotorula glutinis. Biochem. Biophys. Acta, 107,** 383.

LLAGUNO C., FERNANDEZ M.J., GARRIDO M.D. et GARRIDO J. (1970). Influence du taux d'activité de l'alcool-déshydrogénase des levures de « fleur » sur le vieillissement des vins. **Conn. Vigne Vin, 4,** 2, 123.

RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD E. (1962). Application à la vinification de levures métabolisant l'acide malique. **C.R. Acad. Agr., 48,** 11, 558.

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. (1962). **Analisis de vinos.** Ed. Aguilar. Madrid.

SAAVEDRA I. et GARRIDO J. (1962). La levadura de flor en la crianza del vino. Desarrollo sobre medios sintéticos y requerimientos en substancias ternarias y en factores de crecimiento. **Agroq. Tecnol. Alim., 2,** 1.

TARANTOLA C. et GANDINI A. (1967). Esperienze di disacidificazione biologica dei vini nel corso del processo fermentativo. **Vini d'Italia, 51,** 451.