CONTRIBUTION A L'ETUDE DES LEVURES DE COGNAC

II. — ETUDE DES PRODUITS VOLATILS FORMES AU COURS DE LA FERMENTATION PAR LES LEVURES DE COGNAC (*)

Y. H. PARK et A. BERTRAND
Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

PASTEUR, le premier, émit l'hypothèse que « Le vin ordinaire, son goût, ses qualités, dépendent certainement pour une grande part, de la nature spécifique des levures qui se développent pendant la fermentation de la vendange » (1876).

La première application technologique a été l'utilisation en vinification de souches sélectionnées. MÜLLER-THURGAU (1894), étudiant la fermentation des moûts avec des levures apiculées et des levures elliptiques, a constaté que les premières produisent de faibles quantités d'alcool, beaucoup d'acidité volatile et de produits secondaires, et il les considère comme nuisibles.

Par contre, DESCOFFRE (1904) dans ses études sur les levures de Charente montre que les levures apiculées communiquent au vin un intense bouquet favorable à la qualité du cognac.

Pendant longtemps, le rôle exact des levures dans la formation de l'arôme du vin est resté inconnu; il a parfois été exagéré ou au contraire négligé.

En 1956, PEYNAUD compare la formation d'acétate d'éthyle par plusieurs souches de levures au cours de la fermentation alcoolique. Les taux d'acétate d'éthyle sont très variables selon les espèces ; les **Saccharomyces** et **Torulopsis** produisent les plus faibles quantités d'acétate d'éthyle ; les **Kloeckera**, **Saccharomycodes** et particulièrement **Pichia** et **Hansenula** forment des taux d'acétate d'éthyle très élevés.

(*) Travail effectué avec le concours du Bureau national interprofessionnel du Cognac.

PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1958, 1959 et 1962) ont étudié l'influence du pH, de l'aération, de la température et de la concentration du sucre dans le milieu. Ils observent que la formation d'acétate d'éthyle et d'alcools supérieurs est optimale en anaérobiose, à pH 4,5 environ et à 20 °C. Les taux de formation varient considérablement, toutes conditions égales, entre les souches de la même espèce. Les levures appartenant aux genres **Sacch. rosei, T. bacillaris** et **Kl. apiculata** forment d'une manière générale une faible quantité d'alcools supérieurs par rapport à **Sacch. ellipsoideus.** Comparant la formation des alcools supérieurs en fonction de différentes sources d'azote, les auteurs constatent que la réaction d'EHRLICH n'est pas le mécanisme principal de cette formation et que la synthèse des alcools supérieurs peut s'effectuer à partir des sucres, passant par le pyruvate. Ce mécanisme a été confirmé par WEBB et INGRAHAM (1963).

Dès 1960, grâce aux progrès de la technique de la chromatographie en phase gazeuse appliquée à la recherche des composés volatils, de nombreux travaux sont effectués.

GUYMON et **al.**, en 1961, étudient l'influence de l'aération sur la formation des alcools supérieurs. Ils constatent que, en aérobiose dans un milieu agité, la formation d'alcools supérieurs, en particulier celle du méthyl-2 propanol-1, augmente sensiblement et certaines souches oxydatives peu alcoogènes peuvent cependant former des quantités d'alcools supérieurs appréciables.

RANKINE, en 1967, confirme la variabilité des taux de formation en fonction des souches, du pH du milieu et de la température de fermentation.

AYRAPAA, en 1968, observe que dans un milieu où le sulfate d'ammonium constitue la seule source d'azote, l'allure des courbes de formation des divers alcools supérieurs reste sensiblement la même d'une souche à l'autre en fonction de la concentration du milieu en azote. Mais, si le milieu contient des acides aminés, la formation des alcools supérieurs est variable selon l'espèce et la souche. Ceci montre que la synthèse des alcools supérieurs à partir des sucres est à peu près semblable d'une souche à l'autre, tandis que la formation des alcools supérieurs à la fois à partir du sucre et à partir des acides aminés, varie en fonction de l'espèce et même de la souche.

L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse après extraction par l'azote, des substances volatiles formées par quelques souches de levures en milieu synthétique et dans le moût de raisin (BERTRAND, 1968) montre que les esters sont formés en quantité plus importante en anaérobiose, à l'exception du propionate d'éthyle ; par contre les teneurs en alcools supérieurs sont légèrement plus élevées en aérobiose.

SUOMALAINEN (1971), dans son rapport " Les levures et leurs effets sur l'arôme des boissons alcoolisées ", conclue que la matière première contribue pour une partie limitée à la composition aromatique des vins, l'essentiel étant formé par les levures pendant la fermentation. La nature de l'arôme dépend de la levure utilisée et des conditions de la fermentation.

Récemment DAUDT et OUGH (1973) ont étudié la variation des esters volatils de l'acide acétique formés pendant la fermentation du jus de raisin. Ils ont observé que la température de fermentation l'influence fortement. Mais la nature de la levure et la variété du raisin interviennent aussi sur les taux.

NORDSTRÖM (1961, 1962, 1963, 1964 et 1966) a réalisé une série d'études sur la formation des esters par les levures. Il constate que leur formation ne peut pas être expliquée par une simple réaction chimique, mais par une biosynthèse dans laquelle le coenzyme A joue un rôle essentiel.

Si la formation des alcools supérieurs a donné lieu à de nombreux travaux, on peut constater que celle des esters a été beaucoup moins explorée. Cependant, ces substances qui se présentent souvent dans le vin a une faible concentration, jouent un rôle essentiel dans la constitution de l'arôme et dans les sensations organoleptiques et la connaissance des conditions de leur formation est d'un intérêt primordial en œnologie.

Après avoir exposé la préparation des milieux et décrit les méthodes de dosages utilisés ; nous avons étudié la formation des produits volatils au cours de la fermentation alcoolique, en fonction de la souche de levure, de la composition du milieu, jus de raisin ou milieu synthétique à pH 3 et parfois à pH 4 et dans deux conditions d'aération : aérobiose et anaérobiose.

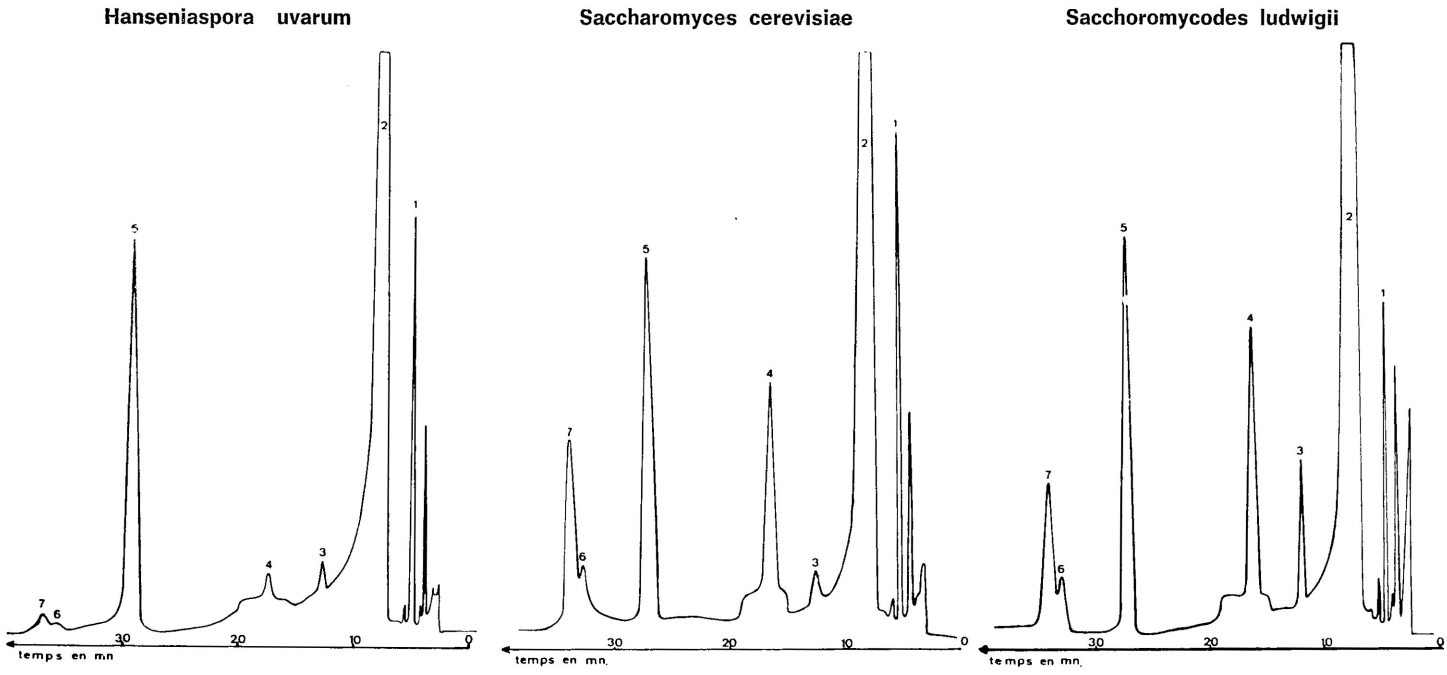


Fig. 1. — Chromatogrammes obtenus après injection directe de 2 µl de milieu fermenté (solution synthétique à pH 3, en anaérobiose) dans une colonne C+H.

Identification des pics : 1. acétate d'éthyle ; 2. éthanol ; 3. propanol-1 ; 4. méthyl-2 propanol-1 ; 5. méthyl-4 pentanol-2 (étalon interne) ; 6. méthyl-2 butanol-1 ; 7. méthyl-3 butanol-1.

DOSAGE QUANTITATIF DES PRODUITS VOLATILS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

I — Préparation des milieux.

a) **jus de raisin** blanc conservé par pasteurisation, du cépage Ugni blanc, qui constitue le vignoble de Cognac.

Après filtration, le jus est réparti dans des bouteilles stériles de 750 ml à raison de 600 ml par bouteille ; elles sont ensuite portées à l'autoclave à 120°C.

b) **milieu synthétique** dont la composition, pour un litre, est la suivante :

Saccharose	180 g	Facteurs de croissance :	
$(NH_4)_2\ SO_4$	180 g	Biotine	20 µg
Asparagine	2 g	Méso inositol	10 mg
KH_2PO_4	2 g	Thiamine	0,2 mg
Acide tartrique	2 g	Pyridoxine	0,2 mg
Acide malique	2 g	Acide nicotinique	0,2 mg
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,2 g	Acide pantothénique. . .	0,2 mg
$MnSO_4$	10 mg		
$FeCl_3$	2 mg		
NaCl	10 mg		

Le milieu est ajusté à pH 3 ou à pH 4 par addition d'une solution d'hydroxyde de potassium concentrée.

Ces différents milieux sont ensemencés avec une culture de trois jours et laissés à fermenter à 25°C pendant un mois.

La fermentation alcoolique est effectuée parallèlement dans deux conditions d'aération - en aérobiose ménagée : en flacon obturé d'un bouchon d'ouate - en anaérobiose : en flacon obturé par un système de barbotage du gaz carbonique.

II. — Dosage des substances volatiles par injection directe.

Nous avons dosé par injection directe les substances présentes à des concentrations importantes : l'acétate d'éthyle, le méthanol et les alcools supérieurs, selon la méthode précédemment décrite (BERTRAND et RIBÉREAU-GAYON, 1972).

A l'aide d'une microseringue, nous injectons 2 µl du milieu fermenté préalablement additionné du 1/10 de son volume d'une solution de méthyl-4 pentanol-2 à 1 g par litre, utilisé comme étalon interne.

L'injection se fait dans un appareil de marque " Varian Aerograph type 1200 " équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne C + H (5 p. 100 de Carbowax 400 + 1. p. 100 de Hallcomid M 18 OL enrobé sur Chromosorb W), dans les conditions suivantes :

Température du four	85°C
Température de l'injecteur	195°C
Débit d'azote	25 ml par minute
Débit d'air	350 ml par minute
Débit d'hydrogène	30 ml par minute

Nous injectons également la même quantité d'une solution témoin de composition suivante:

Acétate d'éthyle : 50 mg ; Méthanol : 100 mg ; Propanol-1 : 25 mg ; Méthyl-2 propanol-1 : 100 mg ; Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 : 250 mg ; ces produits sont dissous dans 1 litre d'une solution contenant 10 p. 100 d'éthanol et la solution ainsi obtenue reçoit également 1/10 de son volume de la solution d'étalon interne.

La concentration d'une substance dans le milieu fermenté est déterminée par rapport à celle de la solution témoin en comparant les hauteurs de leur pic.

III — **Dosage des esters après extraction par un courant d'azote.**

La méthode consiste à extraire les substances volatiles par un courant continu d'azote ; les substances entraînées sont condensées dans des pièges réfrigérés. L'extrait, recueilli dans un tube situé à la partie inférieure du piège, est analysé par chromatographie en phase gazeuse.

a) **Méthode d'extraction**

Nous avons adopté la méthode d'extraction précédemment mise au point (BERTRAND et RIBÉREAU-GAYON, 1970). Dans un vase à extraction on introduit 300 ml de milieu fermenté dont le titre alcoométrique est préalablement ramené à 10 p. 100 par addition d'éthanol pur, exempt de

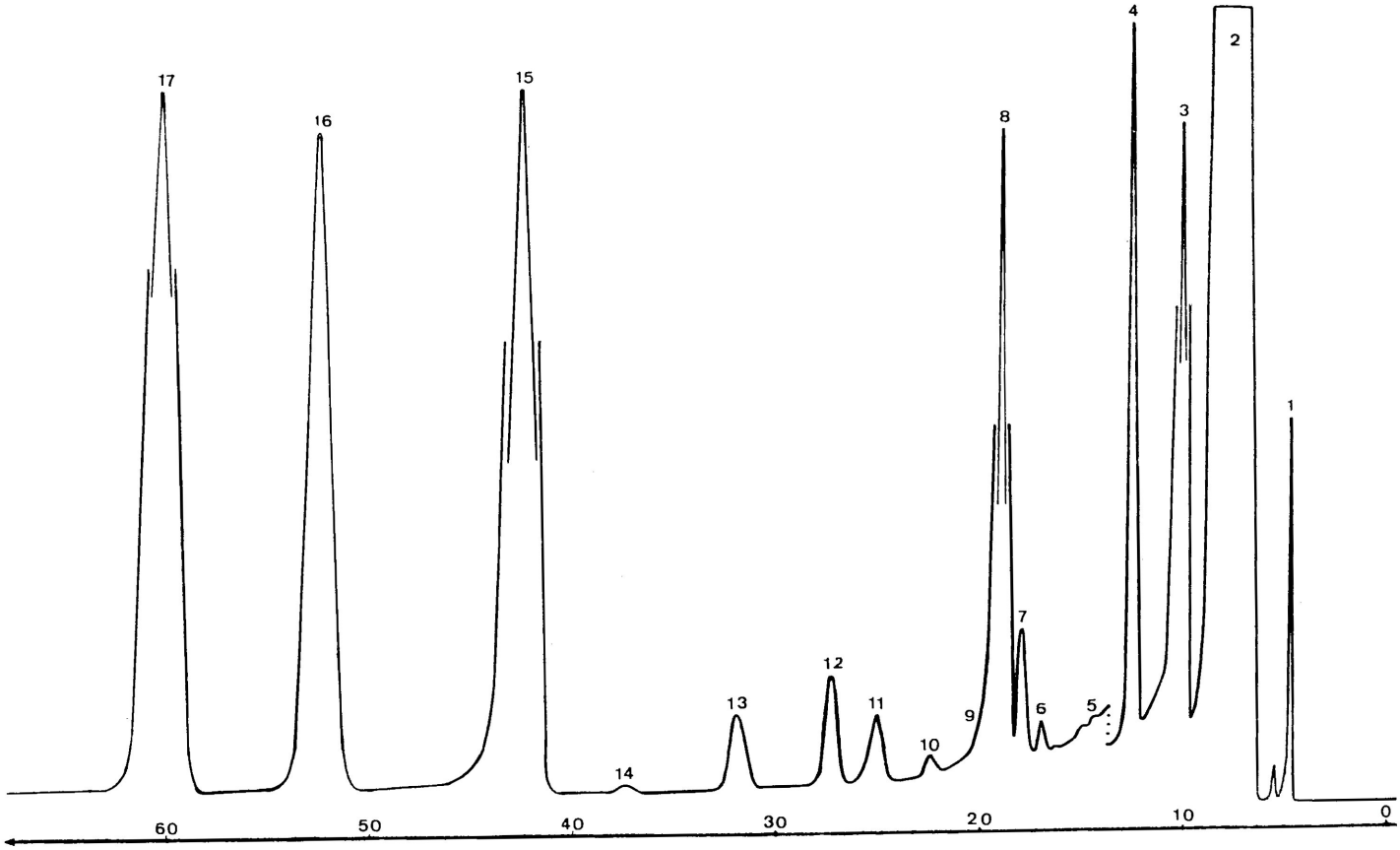


Fig. 2. — Chromatogramme d'un extrait par l'azote d'un milieu fermenté en anaérobiose par **Saccharomyces prostoserdovii.**
Conditions de la chromatographie : Colonne Celanèse ester n° 9 ; température du four 85 °C ; volume injecté 2 µl.

Identification des pics : 1. éthanal ; 2. éthanol ; 3. acétate d'éthyle ; 4. propanol-1 ; 5. butanol-2 ; 6. propionate d'éthyle ; 7. acétal ; 8. méthyl-2 propanol-1 ; 9. non identifié ; 10. méthyl-2 propionate d'éthyle ; 11. non identifié ; 12. acétate de méthyl-2 propyle ; 13. butyrate d'éthyle ; 14. non identifié ; 15. méthyl-2 + méthyl-3 butanol-1 ; 16. méthyl-2 propionate de méthyl-2 propyle (étalon interne) ; 17. acétate de méthyl-3 butyle.

toute trace d'esters et de méthanol. On y ajoute 2 ml de la solution de méthyl-2 propionate de méthyl-2 propyle à 200 mg par litre, utilisé comme étalon interne.

On place le vase à extraction dans un bain-marie thermostaté, dont la température est fixée à 25 °C. Le barbotage d'azote se produit par passage du gaz à travers un perforateur en verre fritté qui se trouve à la partie inférieure du liquide à extraire.

L'ensemble de l'extraction se déroule pendant 30 minutes sous vide partiel (30 cm de mercure) réglé par un robinet à pointeau ; ce vide est mesuré à l'aide d'un manomètre à mercure.

Les substances volatiles entraînées par le courant d'azote traversent deux pièges réfrigérés ; le premier, de forme hélicoïdale, placé dans le vase Dewar contenant de l'eau et de la glace pilée, sert à retenir la majeure partie de l'eau entraînée par l'azote. Le second, droit, est refroidi à —75 °C par un mélange de glace carbonique et d'éthanol. Ce piège est terminé par un petit tube à rodage, de forme conique, dans lequel est recueilli l'extrait qui sera soumis à l'analyse.

b) **Analyse chromatographique.**

Nous utilisons un chromatographe " Aerograph, type 204 " muni d'une colonne de célanèse et d'une colonne de Carbowax 1540, pour les esters les plus volatils et un chromatographe " Varian Aerograph, type 1200 " muni d'une colonne de Carbowax 20 M pour les esters les moins volatils. Les deux appareils sont équipés de détecteurs à ionisation de flamme .

Nous injectons 1,5 µl d'extrait pour l'analyse des esters les plus volatils et 2 µl d'extrait pour l'analyse des esters moins volatils, ainsi qu'un même volume de la solution témoin.

1° **Composition des colonnes.**

Nous utilisons pour support le chromosorb W (de 0,18 à 0,25 mm) préalablement régénéré à 850 °C pendant 4 heures et des colonnes en acier inoxydable de 2,3 mm de diamètre intérieur. La longueur des colonnes est de 7,5 m pour Carbowax 1540 et Célanèse et de 6 m pour Carbowax 20 M.

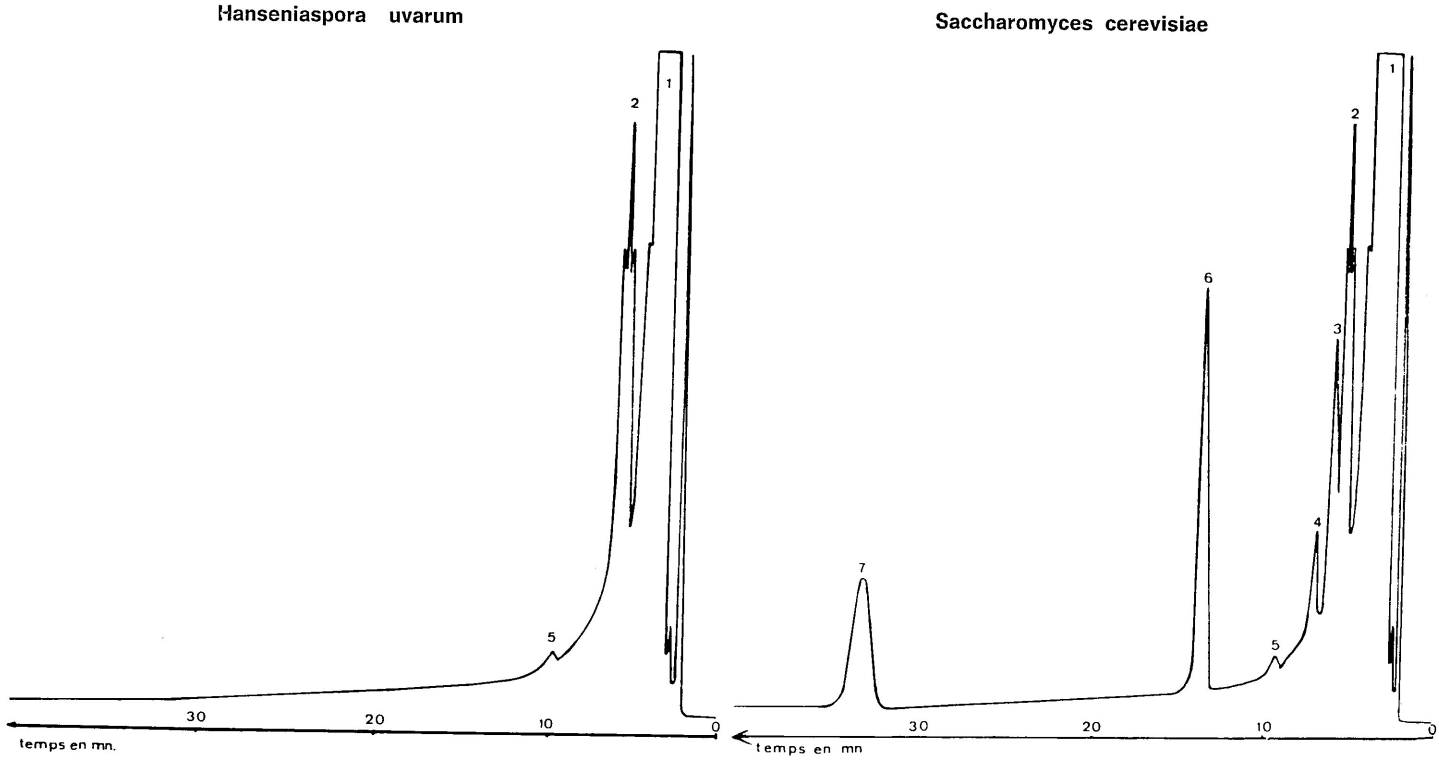


Fig. 3. — Chromatogrammes d'extraits par l'azote de milieux fermentés en anaérobiose
Condition de la chromatographie : Colonne Carb. 20 M ; température du four 125 °C ; volume injecté 2 µl.

Identification des pics : 1. éthanol ; 2. méthyl-2 + méthyl-3 butanol-1 ; 3. caproate d'éthyle ; 4. acétate d'hexyle ; 5. non identifié (présent dans le moût avant fermentation) ; 6. caprylate d'éthyle ; 7. caprate d'éthyle.

Carbowax 1540 : Carbowax 1540 (10 p. 100 enrobé sur Chromosorb w)
Carbowax 20 M : Carbowax 20 M (10 p. 100 enrobé sur Chromosorb w)
Célanèse : Ester n° 9 (10 p. 100 enrobé sur Chromosorb w)

2°) **Réglage des appareils.**

Les appareils sont réglés de la façon suivante :

Aerograph type 204

Température du four	85	°C		
Température de l'injecteur	150	°C		
Débit d'azote dans la colonne Carbowax 1540	25	ml	par	minute
Débit d'azote dans la colonne de Célanèse	30	ml	par	minute
Débit d'air	300	ml	par	minute
Débit de H_2	24	ml	par	minute

Varian Aerograph type 1200

Température du four	125	°C		
Température de l'injecteur	150	°C		
Débit d'azote dans la colonne Carbowax 20 M	30	ml	par	minute
Débit d'air	460	ml	par	minute
Débit de H_2	30	ml	par	minute

3°) **Préparation de la solution témoin**

La solution témoin est préparée par dilution au 1/10 de la solution mère préparée dans une solution hydro-alcoolique à 20 p. 100.

Solution témoin A (pour 1 litre)

Méthanol et méthyl-2 propanol- 1	0,8	g
Propanol-1	0,2	g
Méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1	3	g
Acétate d'éthyle	10	g
Acétate de propyle	12,5	mg
Acétate de méthyl-2 propyle	25	mg
Acétate de méthyl-3 butyle	0,5	mg
Acétate d'hexyle	250	mg
Propionate d'éthyle	250	mg
Butyrate d'éthyle	100	mg
Méthyl-2 propionate d'éthyle	100	mg
Méthyl-3 butyrate d'éthyle	100	mg
Méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1	3	g

Solution témoin B (pour 1 litre)

Acétate de méthyl-3 butyle	0,5 g
Méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1	3 g
Acétate d'hexyle	150 mg
Hexanoate d'éthyle	250 mg
Caprylate d'éthyle	250 mg
Caprate d'éthyle	250 mg
Laurate d'éthyle	50 mg
Myristate d'éthyle	50 mg
Lactate d'éthyle	50 mg
Succinate de diéthyle	50 mg

La détermination de la concentration d'une substance s'effectue par comparaison des hauteurs de pic obtenu avec l'extrait et avec une solution témoin contenant tous les corps à doser en quantité connue et ayant reçu une quantité déterminée d'étalon interne. La teneur d'une substance dans le milieu fermenté est obtenue par le calcul suivant :

$$C = S \times \frac{He}{Hs} \times \frac{It}{Ir} \times \frac{I}{CE}$$

S = Concentration de la substance en mg par litre dans la solution témoin.

He = hauteur du pic correspondant à cette substance pour l'extrait.

Hs = hauteur du pic correspondant à cette substance pour la solution témoin.

It = hauteur théorique du pic de l'étalon interne pour la solution témoin.

Ir = hauteur réelle du pic de l'étalon interne pour l'extrait

CE = coefficient de concentration de la substance

DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE CONCENTRATION

Pour les esters les plus volatils, nous utilisons les coefficients de concentration déjà calculés (BERTRAND et RIBÉREAU-GAYON, 1970), puisque les conditions d'extraction sont identiques à celles précédemment décrites.

Pour les esters les moins volatils, nous avons effectué la détermination des coefficients à partir de la solution témoin B, diluée 600 fois avec

une solution hydroalcoolique à 10 p. 100 ; 300 ml de cette solution additionnée de 2 ml d'une solution d'hexanoate d'hexyle à 22,5 mg par litre, utilisé comme étalon interne, sont introduits dans le vase à extraction. L'extraction est conduite de la manière habituelle ; la même expérience est effectuée à quatre reprises.

Les extraits ainsi obtenus sont chromatographiés sur colonne Carbowax 20 M.

Connaissant la concentration des substances dans l'extrait et leur concentration initiale, nous en déduisons les coefficients de concentration des esters de poids moléculaire élevé.

Coefficients de concentration :

Acétate d'hexyle	500
Caprylate d'éthyle	650
Caprate d'éthyle	450

RESULTATS

I — FORMATION D'ACETATE D'ETHYLE ET DES ALCOOLS SUPERIEURS

Nous avons choisi 21 souches parmi celles qu'un de nous a isolées et décrites (PARK, 1974), et nous les avons cultivées dans le milieu synthétique à pH 3,0 dans les deux conditions d'aération. Les dosages des substances volatiles, acétate d'éthyle et alcools supérieurs, ont été effectués par injection directe du milieu fermenté dans le chromatographe. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau I.

a) Variations des substances volatiles en fonction des genres et des espèces de levures.

Les levures du genre **Saccharomyces** forment peu d'acétate d'éthyle et une quantité importante d'alcools supérieurs.

Les genres **Hanseniaspora** et **Metschnikowia** sont caractérisés par une formation d'acétate d'éthyle assez élevée : 80 à 200 mg par litre. **T. stellata** et **D. phaffii** produisent peu d'acétate d'éthyle et peu d'alcools supérieurs.

Saccharomycodes Ludwigii forme d'importantes quantités de méthyl-2 propanol-1 (BERTRAND 1968). Cette particularité, bien qu'atténuée se retrouve dans nos résultats présents.

Pichia kluyveri forme les taux d'acétate d'éthyle les plus élevés, plus de 500 mg par litre. Ce caractère a été observé également pour les différentes espèces du même genre par PEYNAUD (1956) qui a trouvé des teneurs maximales de 400 mg par litre pour **Pichia membranefaciens** et **Pichia fermentans.**

TABLEAU I

Produits volatils formés au cours de la fermentation dans le milieu synthétique

A = aérobiose ; An = anaérobiose
Sauf indication les chiffres sont des mg par litre.

SOUCHE	Condition	Ethanol p. 100 en volume	Acétate d'éthyle	propanol-1	Méthyl-2 propanol-1	Méthyl-2 butanol-1	Méthyl-3 butanol-1
Sacch. cerevisiae	A	8,72	8	20	28	15	44
	An	8,89	17	15	16	10	44
Sacch. uvarum	A	5,75	4	16	14	12	44
	An	3,92	4	14	16	14	45
Sacch. rosei	A	4,37	2	21	40	20	44
	An	3,36	15	14	22	13	34,5
Sacch. capensis	A	8,37	8	25,5	23,5	14	47
	An	8,73	14	13	8	10	30
Sacch. kluyveri	A	6,12	3	18	20	18	62
	An	4,24	6	14	12	14	52
Sacch. prostoserdovii	A	7,95	10	16	20	36	51
	An	7,17	25	17,5	12,5	11	44
H'spora uvarum	A	3,26	94	6	15	7,5	15
	An	4,88	200	8	17	5	14
H'spora osmophila	A	2,51	82	7	7	4,3	8
	An	2,31	169	5,5	5	3	5
S'des ludwigii	A	5,29	23	7	41	18	58
	An	4,50	71	6	34	12	51
M. pulcherrima	A	5,62	106	4,5	28	11	19
	An	5,16	158	4	32	3	10
D. phaffii	A	3,15	4	6	14	3	16
	An	2,66	2	5,5	15	4	11
P. kluyveri	A	0,76	536	15	34	18	87
	An	1,57	584	13	21	10	35
T. stellata	A	6,78	3	12	13	2	4
	An	6,09	3	8	9	--	3
C. intermedia	A	5,27	3	12,5	18	3	5
	An	5,19	10	18	30	8	12,5

DAUDT et OUGH (1973) ont trouvé environ 400 mg par litre d'acétate d'éthyle dans les milieux fermentés par **P. fermentans.**

Entre les différentes espèces du genre **Saccharomyces,** nous notons des variations peu significatives des alcools supérieurs, alors que RANKINE (1967) a trouvé des différences importantes d'une souche à l'autre, mais les souches qu'il a étudiées sont d'origines très diverses : Californie, Australie, etc.

Il semble que, d'une manière générale, la formation des substances volatiles est un caractère propre aux genres des levures.

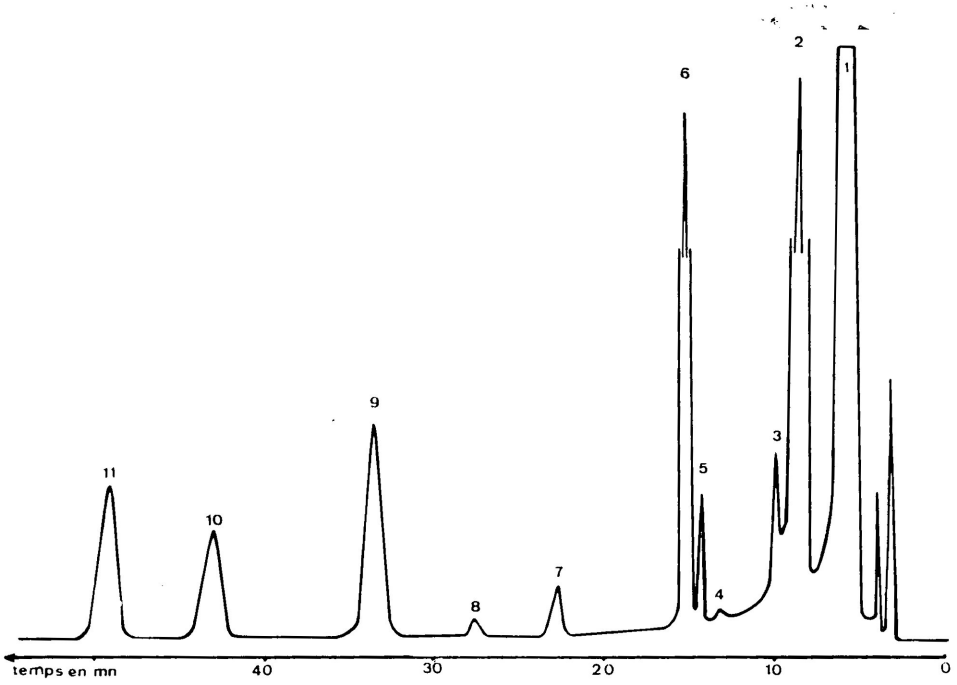


Fig. 4. — Chromatogrammes d'un extrait par l'azote d'une solution synthétique fermentée en aérobose par **Hansenula anomala.**

Condition de la chromatographie : Colonne Célanèse ester n° 9 ; température du four 85 °C : volume injecté 1,5 µ.

Identification des pics : 1. éthanol ; 2. acétate d'éthyle ; 3. propanol-1 ; 4. propionate d'éthyle ; 5. acétal ; 6. méthyl-2 propanol-1 ; 7. acétate de méthyl-2 propyle ; 8. butyrate d'éthyle ; 9. méthyl-2 + méthyl-3 butanol-1 ; 10. méthyl-2 propionate de méthyl-2 propyle (étalon interne) ; 11. acétate de méthyl-3 butyle.

b) **Influence de l'aération**

Il se forme environ deux fois plus d'acétate d'éthyle en anaérobiose qu'en aérobiose sauf pour quelques souches : **Sacch. uvarum, T. stellata** et les souches oxydatives : **P. kluyveri** et **D. phaffii**.

Cette observation avait déjà été effectué pour **Sacch. ellipsoideus, Sacch. oviformis** et **S' des ludwigii** fermentant un jus de raisin (BERTRAND, 1968).

En ce qui concerne les alcools supérieurs, leur formation augmente en aérobiose pour toutes les souches à l'exception de **H'spora uvarum,** cette observation confirme les précédents résultats (BERTRAND, 1968).

De même, en faisant varier le niveau d'aération, GUYMON et **al.** (1961) ont observé en milieu agité une formation supérieure, parfois triple de ce qu'elle peut être en culture statique.

TABLEAU II

L'influence du pH sur la formation d'acétate d'éthyle et des alcools supérieurs

Sauf indication les chiffres sont des mg par litre.

SOUCHE	pH	Ethanol p. 100 en volume	Acétate d'éthyle	Propanol-1	Méthyl-2 Propanol-1	Méthyl-2 butanol-1	Méthyl-3 butanol-1
Sacch. cerevisiae	3,0	9,34	9	20	21	15	44
	4,0	9,43	16	25	27	15	48
Sacch. cerevisiae	3,0	9,25	6	22,5	31	18	54
	4,0	8,72	5	16,5	32	14,5	51
Sacch. cerevisiae	3,0	7,67	7,5	22	34	18	49
	4,0	8,95	9	28	32	19	51
Sacch. uvarum	3,0	5,75	4	16	14	22	44
	4,0	8,43	8	28	22	25,5	62
Sacch. rosei	3,0	4,37	2	21	40	22	44
	4,0	5,85	4	28	35	19	66
Sacch. capensis	3,0	8,37	8	25,5	23,5	14	47
	4,0	10,06	5	32	16	18	45
S'des ludwigii	3,0	6,54	10	8	40	18	61
	4,0	6,36	72	7	38	13	35
H'spora uvarum	3,0	3,26	88	6,5	8	4,5	10
	4,0	2,78	57	8	7	5	10
H'spora osmophila	3,0	2,51	82	7	7	4,5	8
	4,0	3,65	99	10	7	3	6
T. stellata	3,0	6,45	10	15	20	2	4
	4,0	6,35	9	19	23,5	2	4

Il est probable que l'aération en stimulant la croissance et l'activité des levures, augmente de ce fait la demande en azote (GUYMON 1972) et par voie de conséquence la formation des alcools supérieurs.

c) **Influence du pH.**

Nous avons comparé la formation en aérobiose des substances volatiles en milieu synthétique à pH 3 et à pH 4. Les résultats sont rassemblés dans le tableau II.

PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962) ont observé que la formation d'alcools supérieurs est minimum à pH 2,0 et augmente jusqu'à pH 4,5.

De même RANKINE (1967) a observé une augmentation des alcools supérieurs entre pH 3,0 et pH 4,2 surtout pour le méthyl-2 propanol-1 et l'alcool isoamylique.

Cependant, dans nos essais nous constatons qu'entre pH 3,0 et 4,0, il n'existe aucune différence significative.

II — ETUDE DES ESTERS FORMES AU COURS DE LA FERMENTATION

Nous avons utilisé le jus de raisin et le milieu synthétique à pH 3,0 dans deux conditions d'aération pour étudier la formation des esters au cours de la fermentation par les différentes souches de levures.

Les dosages ont été effectués après extraction, par chromatographie en phase gazeuse, et les résultats sont rassemblés dans le Tableau III.

a) **Formation d'acétate d'éthyle.**

Toutes les espèces du genre **Saccharomyces** et les espèces **T. stellata** et **T. lactis condensi** forment les taux d'acétate d'éthyle les plus bas ; ils ne dépassent pas 50 mg par litre.

P. polymorpha, **N. elongata** et **C. sake** peuvent être classées dans le même groupe.

S'des ludwigii et **M. pulcherrima** produisent 60 à 140 mg par litre d'acétate d'éthyle .

Le genre **Hanseniaspora** en forme une quantité plus importante, 100 à 400 mg par litre.

Les études de NORDSTRÖM (1964) montrent que l'acétate d'éthyle constitue un produit secondaire synthétisé à partir de l'éthanol et d'acétylcoenzyme A, la synthèse d'acétate d'éthyle étant très étroitement liée au taux d'éthanol formé.

Les espèces à voile superficiel, **P. kluyveri** et **H. anomala** produisent un taux d'acétate d'éthyle extrèmement élevé en aérobiose ; **H. anomala** atteint jusqu'à 7 g par litre avec un taux d'éthanol très faible.

TABLEAU III

Formation d'acétate d'éthyle dans le moût

A = aérobiose ; An = anaérobiose
Les teneurs en acétate d'éthyle sont exprimées en mg par litre.

SOUCHE	Condition	Ethanol p. 100 en volume	Acétate d'éthyle	SOUCHE	Condition	Ethanol p. 100 en volume	Acétate d'éthyle
Sacch. cerevisiae PP1	A	6,86	13	**H'spora uvarum**	A	4,37	243
	An	7,39	37		An	4,15	175
Sacch. cerevisiae TP10	A	7,18	14	**H'spora osmophila**	A	3,54	341
	An	7,32	25		An	3,85	119
Sacch. cerevisiae FF12	A	7,18	14	**H'spora valbyensis**	A	4,00	228
	An	7,41	31,5		An	2,35	108
Sacch. uvarum	A	7,19	10,5	**S'des ludwigii**	A	6,60	83
	An	6,86	22		An	3,54	130
Sacch. rosei	A	6,50	11	**H. pulcherrima**	A	7,40	64
	An	3,16	15		An	6,91	140
Sacch. chevalieri	A	6,99	19	**P. polymorpha**	A	7,09	14
	An	6,68	27,5		An	6,29	18
Sacch. capensis	A	2,69	3	**P. kluyveri**	A	6,81	562
	An	1,69	1		An	3,45	156
Sacch. pretoriensis	A	7,57	15	**H. anomala**	A	1,67	7080
	An	7,46	27		An	0,99	102
Sacch. cidri	A	7,34	21	**N. elongata**	A	3,13	13
	An	6,22	28		An	2,53	24
Sacch. kluyveri	A	7,09	8	**T. stellata**	A	3,46	8
	An	6,40	15		An	1,86	3
Sacch. bayanus	A	7,50	14	**T. etchellsii**	A	3,08	220
	An	6,66	21		An	1,13	95
Sacch. diastaticus	A	7,31	15	**T. lactis-condensi**	A	6,24	1
	An	6,77	25,5		An	4,84	16
Sacch. prosto serdowi	A	6,95	15	**C. sake**	A	3,60	4
	An	7,00	27		An	0,72	1
Sacch. globosus	A	7,09	15	**D. phaffii**	A	5,43	12
	An	7,32	18,5		An	4,54	9

Le genre **Hansenula** présente un caractère typique de la formation des esters liés à la respiration. Ce qui explique les taux très importants d'acétate d'éthyle observés seulement en aérobiose.

b) **Formation des esters éthyliques d'acides gras de faible poids moléculaire.**

Dans le groupe des esters éthyliques nous avons dosé le propionate d'éthyle, le butyrate d'éthyle et le méthyl-2 propionate d'éthyle. Nous n'avons pas trouvé de méthyl-3 butyrate d'éthyle.

TABLEAU IV

Propionate d'éthyle formé par les levures dans le moût et en milieu synthétique

Les chiffres sont des mg par litre

Milieu	Moût		Solution synthétique	
Condition d'aération	Aérobiose	Anaérobiose	Aérobiose	Anaérobiose
Sacch. cerevisiae Brd3	0,04	0,03	0,04	0,03
Sacch. cerevisiae PP1	—	0,02	—	0,02
Sacch. cerevisiae FF12	0,01	0,02	—	—
Sacch. uvarum	0,05	0,04	0,11	0,57
Sacch. rosei	0,17	0,06	0,12	0,17
Sacch. chevalieri	—	—	0,05	—
Sacch. capensis	0,03	—	0,03	—
Sacch. pretoriensis	0,03	0,05	—	0,06
Sacch. cidri	0,05	0,02	0,03	0,03
Sacch. kluyveri	0,05	0,03	0,10	0,04
Sacch. diastaticus	0,03	0,03	0,02	0,02
Sacch. prostoserdovii	0,04	0,03	0,03	—
Sacch. globosus	0,05	0,07	—	—
H'spora uvarum Mn4	0,05	0,03	0,03	0,04
H'spora uvarum Brm1	0,02	0,03	—	—
H'spora osmophila	0,09	0,02	0,05	0,05
H'spora valbyensis	—	0,03	—	—
S'des ludwigii	0,21	0,62	0,15	0,22
P. Polyphorma	0,04	0,03	—	0,04
P. kluyveri	3,02	0,37	1,11	0,19
H. anomala	0,86	0,04	1,09	—
T. stellata	0,08	—	—	—
T. Etchellsii	0,04	0,10	0,04	—

Les résultats concernant la formation de propionate d'éthyle dans le moût de raisin et en milieu synthétique pour différentes levures sont ras-

semblés dans le tableau IV. Le propionate d'éthyle est formé en quantité très variable pour toutes les espèces de **Saccharomyces,** la teneur est maximum pour **Sacch. rosei.**

TABLEAU V

Formation de butyrate d'éthyle et de méthyl-2 propionate d'éthyle

A = aérobiose ; An = anaérobiose — Les chiffres sont des mg par litre

Ester	Butyrate d'éthyle				Méthyl-2 propionate d'éthyle			
Milieu	Moût		Sol. synth.		Moût		Sol. synth.	
Conditions d'aération	A	An	A	An	A	An	A	An
Sacch. cedevisiae PP1	0,02	0,03	—	0,04	0,02	0,02	—	—
Sacch. cerevisiae TP10	—	0,04	—	0,03	—	—	—	—
Sacch. cerevisiae FF12	—	0,03	—	0,03	0,01	0,02	—	—
Sacch. cerevisiae Brd3	0,03	0,06	0,04	0,04	0,02	0,02	—	—
Sacch. uvarum	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacch. rosei	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacch. chevalieri	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacch. pretoriensis	0,02	0,08	—	—	0,02	0,02	—	—
Sacch. cidri	—	0,02	—	—	0,01	0,04	0,02	0,03
Sacch. kluyveri	0,75	0,04	0,39	—	0,03	0,05	0,03	—
Sacch. diastaticus	—	—	—	0,04	—	—	—	—
Sacch. Bayanus	—	0,04	—	0,03	0,03	0,02	—	—
Sacch. prostoserdovii	0,05	0,05	—	—	—	—	—	—
Sacch. globosus	0,04	0,07	—	—	—	—	—	—
S'des ludwigii	0,03	0,06	0,0	0,14	—	—	—	—
P. kluyveri	—	—	—	—	0,11	—	0,05	—
H. anomala	0,25	0,08	0,12	—	—	—	—	—

Pour **Sacch. cerevisiae,** nous avons trouvé une quantité de propionate d'éthyle beaucoup plus faible que celle précédemment observée (BERTRAND, 1968). **S' des ludwigii** en produit une quantité appréciable.

P. kluyveri et **H. anomala** produisent en aérobiose une quantité très élevée de propionate d'éthyle, 0,8 et 3 mg par litre.

Les vins blancs contiennent environ 0,15 à 0,30 mg par litre de propionate d'éthyle (BERTRAND 1968). Comme dans le cas de l'acétate

d'éthyle le taux particulièrement important de propionate d'éthyle dans le vin est dû au développement des genres **Pichia, Hansenula** ou des bactéries lactiques.

La formation de butyrate d'éthyle est observée pour les genres **Saccharomyces, Hansenula** et **Saccharomycodes** et le méthyl-2 propionate d'éthyle n'est formé que par le genre **Saccharomyces** et par **P. kluyveri** (Tableau V). Le jus de raisin que nous avons employé comme milieu de culture contenait avant fermentation 0,03 mg par litre de butyrate d'éthyle.

Nous constatons que pendant la fermentation le butyrate d'éthyle peut être assimilé ou synthétisé par les levures.

Sacch. uvarum, Sacch. chevalieri et **Sacch. rosei** ne forment pas ces deux esters.

S'des ludwigii produit une importante quantité de méthyl-2 propionate d'éthyle ; cette observation est en désaccord avec les précédents résultats (BERTRAND 1968).

P. kluyveri en produit aussi beaucoup surtout en aérobiose.

Pour les deux esters, la formation est en moyenne inférieure en milieu synthétique à ce qu'elle est dans le moût, surtout en ce qui concerne le méthyl-2 propionate d'éthyle. Il est probable que leur formation dépend de la constitution du milieu et notamment de la teneur en facteurs de croissance susceptibles d'intervenir dans les réactions enzymatiques de synthèse.

Dans tous les cas, à l'exception de **P. kluyveri,** la teneur en ces deux esters augmente considérablement en anaérobiose.

NORDSTRÖM (1964) ne trouve aucune formation de propionate d'éthyle, butyrate d'éthyle et méthyl-2 propionate d'éthyle par **Sacch. cerevisiae** au cours de la fermentation dans le milieu synthétique contenant les acides correspondants. Nos résultats montrent cependant que ces esters sont formés au cours de la fermentation, indépendamment de la présence des acides correspondants dans le milieu.

c) **Formation des esters de l'acide acétique.**

Nous avons étudié les esters suivants : acétate de méthyl-2 propyle, acétate de méthyl-3 butyle et acétate d'hexyle. Nous n'avons pas trouvé d'acétate de propyle en quantité dosable. Les résultats sont reportés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Formation d'esters d'acide acétique dans le moût et en milieu synthétique par les différentes levures

A = aérobiose ; An = anaérobiose — Les chiffres sont des mg par litre

Ester	Acétate de méthyl-2 propyle		Acétate de méthyl-3 butyle				Acétate d'hexyle	
Milieu	Moût		Moût		Sol. synth.		Moût	
Condition d'aération	A	An	A	An	A	An	A	An
Sacch. cerevisiae PP1	—	0,040	0,10	0,44	0,02	0,12	0,01	0,07
Sacch. cerevisiae TP10	—	0,055	0,14	0,49	0,07	0,18	0,01	0,04
Sacch. cerevisiae FF12	—	0,050	0,12	0,44	0,05	0,19	0,01	0,07
Sacch. uvarum	—	0,020	0,14	0,39	0,01	0,21	—	0,02
Sacch. rosei	—	—	0,06	0,03	—	—	—	—
Sacch. chevalieri	—	—	0,28	0,93	0,18	0,20	—	—
Sacch. capensis	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacch. pretoriensis	0,020	0,080	0,02	0,08	—		—	—
Sacch. cidri	—	0,070	0,25	0,97	0,22	0,49	—	0,09
Sacch. kuyveri	—	0,045	0,16	0,04	0,17	0,35	—	0,28
Sacch. bayanus	—	—	0,27	0,88	0,16	0,32	—	—
Sacch. diastaticus	—	0,040	0,29	0,60	0,09	0,25	0,03	0,08
Sacch. protoserdovii	—	0,115	0,74	1,68	0,17	0,33	0,06	0,15
Sacch. globosus	0,045	0,110	0,49	1,09	0,06	0,4	0,04	0,09
H'spora uvarum	—	—	0,06	0,09	0,07	0,07	—	—
H'spora osmophila	—	—	0,11	0,21	0,07	0,14	—	—
S'des ludwigii	—	—	0,12	0,28	0,08	0,07	—	—
P. polymorpha	—	—	0,03	0,26	0,02	0,14	—	—
P. kluyveri	—	—	0,44	0,01	0,16	0,01	—	—
H. anomala *	0,675	0,300	2,43	0,23	1,70	0,10	—	—
T. stellata	—	—	—	—	—	—	—	—
T. etchellsii	—	—	0,23	0,06	0,01	—	—	—
C. sake	—	—	0,04	—	0,04	—	—	—

* Formation d'acétate de méthyl-2 propyle en solution synthétique en aérobiose : 0,82 mg par litre.

Parmi les trois esters, l'acétate de méthyl-3 butyle est formé en quantité la plus importante.

Dans le genre **Saccharomyces,** c'est **Sacch. prostoserdovii** qui produit la plus grande quantité de ces esters.

Nous n'avons pas trouvé d'acétate de méthyl-2 propyle et d'acétate d'hexyle dans les milieux synthétiques exception faite pour celui fermenté par **H. anomala.**

Comme dans le cas du butyrate d'éthyle et du méthyl-2 propionate d'éthyle, la synthèse est très sensiblement influencée par la composition du milieu.

Les résultats de DAUDT et OUGH (1973) montrent que une souche de **Sacch. cerevisiae** forme à peu près la même quantité d'acétate de méthyl-2 propyle et d'acétate de méthyl-3 butyle.

Le taux des esters de l'acide acétique augmente toujours très nettement en anaérobiose, sauf pour quelques espèces oxydatives.

d) **Formation des esters éthyliques d'acides gras de poids moléculaire élevé.**

Nous avons étudié les trois esters d'acides gras de poids moléculaire élevé qui se présentent en quantités les plus importantes : caproate d'éthyle, caprylate d'éthyle et caprate d'éthyle. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau VII.

Ces esters sont formés principalement par les levures du genre **Saccharomyces, P. polymorpha** est la seule autre espèce qui produit ces esters.

Dans tous les autres cas, nous n'avons pas trouvé ces esters, du moins à concentration décelable, par la technique utilisée. La formation de ces trois esters est nettement supérieure en anaérobiose.

Les levures du genre **Saccharomyces** sont bien caractérisées par leur capacité à synthétiser les esters " lourds " qui sont en grande partie responsables de l'arôme spécifique des cognacs.

Sacch. uvarum et **Sacch. rosei** se distinguent très nettement des levures appartenant à ce genre. La première forme des quantités relativement élevées de caproate d'éthyle et pas de caprate d'éthyle. La deuxième ne forme pas de caproate d'éthyle et cependant des quantités sensibles de caprylate d'éthyle et de caprate d'éthyle.

TABLEAU VII

Formation des esters éthyliques d'acides gras dans le moût et en milieu synthétique

A = aérobiose ; An = anaérobiose

Les chiffres sont des mg par litre

Ester	Caproate d'éthyle				Caprylate d'éthyle				Caprate d'éthyle			
Milieu	Moût		Sol. synth.		Moût		Sol. synth.		Moût		Sol. synth.	
Condition d'aération	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An
Sacch cerevisiae PP1	0,11	0,21	0,05	0,17	0,26	0,42	0,12	0,48	0,11	0,31	0,07	0,65
Sacch. cerevisiae TP10	0,09	0,24	0,09	0,29	0,23	0,42	0,09	0,18	0,08	0,33	0,03	0,10
Sacch. cerevisiae FF12	0,07	0,13	0,07	0,24	0,23	0,42	0,15	0,28	0,14	0,38	0,09	0,18
Sacch. uvarum	0,13	0,22	0,17	0,25	—	0,01	—	—	—	—	—	—
Sacch. rosei	—	—	—	—	0,03	0,12	—	0,01	0,04	0,05	—	0,07
Sacch. chevalieri	0,25	0,42	0,17	0,19	0,24	0,36	0,32	0,21	0,12	0,40	0,17	0,19
Sacch. kluyveri	0,14	0,28	0,11	0,16	0,02	0,03	—	0,04	—	0,02	—	0,04
Sacch. pretoriensis	0,19	0,37	0,14	0,18	—	0,09	0,03	—	—	0,18	—	0,02
Sacch. globosus	0,19	0,42	0,05	0,20	0,32	0,47	0,08	0,09	0,10	0,28	0,06	0,03
Sacch. prostoserdovii	0,06	0,19	0,09	0,22	0,28	0,33	0,12	0,12	0,26	0,30	0,09	0,15
Sacch. bayanus	0,09	0,38	0,20	0,28	0,08	0,59	0,18	0,13	0,06	0,15	0,03	0,04
Sacch. capensis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P. polymorpha	0,06	0,16	0,05	0,07	0,06	0,12	0,06	0,07	0,09	0,30	0,11	0,09

Du point de vue biochimique, ces résultats montrent que la synthèse de ces trois esters n'est pas catalysée par un même système enzymatique estérase, mais qu'il existe pour cela une ou plusieurs enzymes spécifiques de chaque ester.

TABLEAU VIII

Acétal formé au cours de la fermentation

Les teneurs en acétal sont exprimées en mg par litre

Souche	Condition d'aération	Ethanol P. 100 en Volume	Acétal
Sacch. cerevisiae	A	7,62	0,73
	An	7,16	0,40
Sacch. rosei	A	6,50	0,40
	An	3,16	0,29
Sacch. capensis	A	2,69	0,52
	An	2,69	0,10
Sacch. chevalieri	A	6,99	0,61
	An	6,68	0,27
Sacch. cidri	A	7,34	1,32
	An	6,22	3,52
H'spora uvarum	A	4,37	0,72
	An	4,15	0,27
H'spora osmophila	A	3,54	0,61
	An	3,85	0,26
H. valbyensis	A	4,00	0,97
	An	2,35	0,74
S'des ludwigii	A	6,66	0,99
	An	3,34	0,39
N. elongata	A	3,13	0,40
	An	2,53	0,25
M. pulcherrima	A	0,97	0,11
	An	0,45	0,19
P. kluyveri	A	6,27	4,88
	An	4,76	1,49
H. anomala	A	1,67	4,00
	An	0,99	0,20
T. stellata	A	3,46	1,65
	An	1,84	0,30
T. etchellsii	A	3,08	0,69
	An	1,13	0,24
C. sake	A	3,60	0,26
	An	0,72	0,31

TABLEAU IX

Substances volatiles formées au cours de la fermentation par quelques souches de levures

Les résultats sont exprimés en mg par litre — A = Aérobiose — An = Anaérobiose

Souche	Saccharomyces cerevisiae				Hanseniaspora uvarum				Saccharomycodes ludwigii				Hansenula anomala			
Milieu	Moût		Sol. synth.		Moût		Sol. synth.		Moût		Sol. synth.		Moût		Sol. synth.	
Condition d'aération	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An
Ethanol (% en volume)	6,86	7,39	9,43	9,59	4,37	4,15	2,30	1,54	6,60	3,54	3,03	3,03	1,67	0,99	4,60	1,43
Méthanol	12,6	11,0	—		10,2	14,9	—	—	13,5	15	—	—	10,5	9,4	—	—
Propanol-1	37,5	27,5	21	17,5	12	10	13	4	27	26	11	18	3	6	26	57
Méthyl-2 propanol-1	112	57	25	26	16	14	13	6	130	79	33	78	24	7	52	31
Méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1	162	104	66	80	31	32	23	13	291	198	177	195	46	23	127	67
Acétate d'éthyle	13	37	19	33	148	114	106	81	81	143	47	44	7080	102	2980	51
Propionate d'éthyle	—	0,02	—	0,02	0,04	0,03	0,03	0,04	0,16	0,71	0,11	0,16	0,86	0,04	1,14	—
Butyrate d'éthyle	0,02	0,02	—	0,04	—	—	—	—	0,03	0,06	0,06	0,21	0,25	0,07	0,12	—
Méthyl-2 propionate d'éthyle	0,02	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acétate de propyle	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acétate de méthyl-2 propyle	—	0,04	—	—	—	—	—	—					0,68	0,03	0,40	—
Acétate de méthyl-3 butyle	0,10	0,44	0,02	0,12	0,07	0,10	0,08	0,08	0,12	0,28	0,08	0,07	2,43	0,22	1,69	0,09
Acétate d'hexyle	0,01	0,07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Caproate d'éthyle	0,10	0,21	0,05	0,17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Caprylate d'éthyle	0,26	0,41	0,12	0,43	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Caprate d'éthyle	0,11	0,31	0,07	0,65	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acétal	0,73	0,40	0,63	0,38	0,70	0,27	0,35	0,22	0,99	0,39	0,27	0,27	4,00	0,20	3,27	0,30

III — FORMATION D'ACETAL AU COURS DE LA FERMENTATION.

Le genre **Saccharomyces** produit moins de 1,0 mg par litre, exception faite de **Sacch. Cidri** qui en forme des quantités plus fortes : de 1 à 3,5 mg par litre. La teneur est aussi très élevée dans les moûts fermentés par **P. kluyveri** et **H. anomala,** notamment en aérobiose : 4 à 5 mg par litre.

Notons que la capacité des levures à former de l'acétal est toujours plus développée en aérobiose qu'en anaérobiose, (Tableau VIII),

Peu d'études se rapportent au phénomène de cette formation au cours de la fermentation alcoolique.

Dans les eaux de vie elle découle d'une réaction d'acétalisation au cours du vieillissement.

$$CH_3CHO + 2\ C_2H_5OH \longrightarrow CH_3CH < \begin{matrix} O\text{-}C_2H_5 \\ O\text{-}C_2H_5 \end{matrix} + H_2O$$

Ceci ne suffit pas à expliquer les doses relativement élevées de ce corps que nous observons après un mois de fermentation dans des milieux dont la teneur en éthanol ne dépasse pas 10 p. 100. Cette réaction qui est très lente s'opère dans les cognacs où la concentration en alcool est très élevée.

Il est probable, comme pour les esters, que l'acétal est synthétisé par les levures au cours de la fermentation.

BARAUD (1961) a trouvé de grandes différences dans les teneurs en acétal en fonction du cru : ce corps n'existe qu'à l'état de trace dans la " tête " de Grande Champagne, tandis que celle de Fin Bois en contient des quantités appréciables.

L'acétal est un produit très volatil ; on pense qu'il est un facteur important de la qualité du Cognac.

CONCLUSION

Nos résultats confirment le rôle essentiel des levures dans la formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Les caractères organoleptiques d'un milieu fermenté dépendent en grande partie de la nature et de la quantité des produits volatils formés par les souches de levures.

Ces produits sont généralement propres au genre mais certaines souches peuvent aussi présenter des capacités bien spécifiques.

1°) Les souches du genre **Saccharomyces** forment des quantités importantes d'alcools supérieurs et généralement elles produisent des teneurs élevées de tous les esters que nous avons étudiés, exception faite de l'acétate d'éthyle, esters éthyliques d'acides gras et esters de l'acide acétique qui constituent l'arôme fruité, de même que les esters éthyliques d'acides gras lourds qui jouent un rôle essentiel dans l'arôme du cognac.

Notons que seules les levures appartenant à ce genre sont capables de synthétiser des esters éthyliques d'acides gras lourds, à 6 atomes de carbone ou plus, en quantité appréciable.

2°) Le genre **Hanseniaspora** forme peu d'alcools supérieurs et peu d'esters mais de l'acétate d'éthyle en quantité assez élevée.

3°) **Saccharomycodes ludwigii** libère dans le milieu des taux non négligeables de méthyl-2 propanol-1, de propionate d'éthyle et de butyrate d'éthyle.

4°) Les espèces oxydatives, notamment **H. anomala** et **P. kluyveri** possèdent un caractère particulier ; elles produisent des esters par une voie métabolique différente des autres levures ; en aérobiose les levures forment certains esters en quantité extrêmement élevée : acétate d'éthyle, propionate d'éthyle, méthyl-2 propionate d'éthyle, acétate de méthyl-3 butyle ainsi que de l'acétal dans les mêmes conditions d'aération.

5°) Les espèces du genre **Torulopsis, Metchnikowia, Nadsonia** et **Candida** forment d'une manière générale peu d'alcools supérieurs et peu d'esters.

Nos résultats mettent en évidence le rôle primordial des levures du genre **Saccharomyces** dans la vinification Charentaise. Théoriquement on pourrait envisager l'utilisation éventuelle en vinification d'une souche sélectionnée de **Saccharomyces.**

D'autre part, les espèces oxydatives susceptibles de se développer pendant le temps de stockage du vin avant sa distillation entraînent par leur production d'acétate d'éthyle des modifications défavorables dans la composition aromatique du cognac.

Les conditions d'aération au cours de la fermentation interviennent aussi sur la formation des substances volatiles. A l'abri de l'air, d'une part, la formation d'alcools supérieurs diminue, d'autre part les esters augmentent considérablement, en outre, la production d'acétate d'éthyle par les levures oxydatives et du genre **Hanseniaspora** diminue fortement.

Il serait souhaitable que ces résultats puissent être vérifiés dans la pratique de la vinification, car il nous paraissent d'un grand intérêt technologique.

Nos études comparatives de la formation des esters et d'acétal en fonction des souches nous permettent d'émettre quelques hypothèses sur cet aspect de leur métabolisme dont les processus sont mal connus.

1°) Les esters sont formés au cours de la fermentation alcoolique, que les acides correspondants soient présents ou non dans le milieu.

2°) D'après nos résultats, nous supposons qu'il n'existe pas un seul système enzymatique estérase pour la synthèse de l'ensemble des esters, mais que la synthèse de chaque ester est déterminée par un système enzymatique propre.

3°) L'acétal trouvé dans le cognac provient, outre de la réaction chimique d'acétalisation au cours du vieillissement, pour une part non négligeable, de la synthèse par les levures au cours de la fermentation.

Cette étude nous a permis d'approfondir certaines connaissances théoriques directement applicables à la technique, en particulier l'influence des levures sur la production des substances volatiles impliquées dans l'arôme du cognac ; par ce biais ont pu être abordés certains aspects mal connus du métabolisme levurien.

Manuscrit reçu le 21 novembre 1974.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

.. ..

AYRAPAA T., 1968. Formation of higher alcohols by various yeast. **J. Inst. Brewing,** Vol. **74,** 169-178.

BARAUD J., 1961. Etude quantitative, par chromatographie en phase vapeur, des alcools et esters de la fermentation alcoolique. **Bull. Soc. Chim.,** 1874-1877.

BERTRAND A., 1968. Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des constitutants volatils du vin. **Thèse 3ème cycle,** Bordeaux.

BERTRAND A. et RIBÉREAU-GAYON P., 1970. Dosage des constituants volatils du vin par chromatographie en phase gazeuse. **Ann. Falsif. Fraudes, 63,** n° 691, 148-156.

BERTRAND A. et RIBÉREAU-GAYON P., 1972. Dosage simultané dans le vin, par chromatographie en phase gazeuse, de l'acétate d'éthyle, du méthanol, du méthyl-2 propanol-1, du propanol-1, du butanol-2, du butanol-1 et du mélange méthyl-2 butanol-1 et méthyl-3 butanol-1, feuillets verts, O.I.V., 409 bis.

DAUDT C.E. et OUGH C. S., 1973. A method for quantitative measurement of volatile acetate esters from wine. **Amer. J. Enol. Vitic.,** vol. **24,** n° 3 , 125-129.

DAUDT C.E. et OUGH C.S., 1973. Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation ; effects of fermentation temperature, SO_2, yeast strain and grape variety. **Amer. J. Enol. Vitic.,** vol. **34,** n° 3, 130-135.

DESCOFFRE A., 1904. Etude sur les levures œnogènes des Charentes. **Thèse Pharmacie.** Bordeaux.

GUYMON J. F., INGRAHAM J. L. et CROWELL E. A., 1961. Influence of aeration upon the formation of higher alcohols by yeasts. **Amer. J. Enol. Vitic.,** vol. **12,** n° 2, 60-66.

GUYMON J. F., 1972. Higher alcohols in beverage brandy. **Wines and Vines,** vol. **1,** 37-40.

MÜLLER-THURGAU H., 1894, Bericht Schweiz-Versuch., Wädenswill.

NORDSTRÖM K., 1692, Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. **J. Inst. Brewing,** vol. **67,** 173-181.

NORDSTRÖM K., 1961. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. II - Kinetics of formation from ethanol and influence of acetaldehyde. **J. Inst. Brewing,** vol. **68,** 188-196.

NORDSTRÖM K., 1962. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. III. Participation of coenzyme A. **J. Inst. Brewing,** Vol. **68,** 398-407.

NORDSTRÖM K., 1963. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. IV - Metabolism of acetyl coenzyme A. **J. Inst. Brewing,** Vol. **69,** 142-153.

NORDSTRÖM K., 1963. Formation of esters, from acids by brewer's yeast. I. Kinetic theory and basic experiments. **J. Inst. Brewing,** Vol. **69,** 310-322.

NORDSTRÖM K., 1963. Formation of esters, acids and alcohols from α-keto acids by brewer's yeast. **J. Inst. Brewing,** Vol. **69,** 483-495.

NORDSTRÖM K., 1963. Formation of esters from acids by brewer's yeast. II. Formation from lower fatty acids. **J. Inst. Brewing,** Vol. **70,** 42-55.

NORDSTRÖM K., 1964. Formation of esters from acids by brewer's yeast. III - Formation by various strains. **J. Inst Brewing,** Vol. **70,** 226-233.

NORDSTRÖM K., 1964. Formation of esters from alcohols by brewer's yeast **J. Inst. Brewing,** Vol. **70,** 328-336.

NORDSTRÖM K., 1966. Formation of esters from lower fatty acids by various yeast species. **J. Inst. Brewing,** Vol. **72,** 38-40.

PARK Y. H., 1974. Contribution à l'étude des levures de Cognac. **Thèse 3ème cycle.** Bordeaux.

PEYNAUD E. 1956. Sur la formation d'acétate d'éthyle par les levures du vin. **Ind. agric. alim., 73,** 253-257.

PEYNAUD E. et GUIMBERTEAU G., 1958. Sur la teneur des vins en alcools supérieurs. Estimation séparée des alcools isobutylique et isoamylique. **Ann. Fals. Fraudes, 51,** n° 591-593, 70-80.

PEYNAUD et GUIMBERTEAU. G., 1959. Mécanisme de la formation des alcools supérieurs au cours de la fermentation alcoolique. **C. R. Acad. Sci., 248,** 868.

PEYNAUD E. et GUIMBERTEAU G., 1962. Sur la formation des alcools supérieurs par les levures de vinification. **Ann. Tech. agric. 11,** n° 2, 85-105.

RANKINE B. C., 1967. Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. **J. Sci. Fd. Agric.,** vol. **18,** 583-589.

SUOMALAINEN H. et NYKÄNEN L., 1964. The formation of aroma compounds by yeast in sugar fermentation. **Suomen kemistilehti,** vol. **37, 12,** 230-232.

SUOMALAINEN H. et KERÄNEN A. J. A., 1967. Keto acids formed by baker's yeast. **J. Inst. Brewing,** vol. **73,** 477-484.

SUOMALAINEN H., 1971. Yeast and its effects on the flavour of alcoholic beverages. **J. Inst. Brewing,** vol. **77,** 164-177.

WEBB A. D. et INGRAHAM J. L., 1963. Fusel oil. **Adv. Appl. Microbiol.,** vol. **5,** 317-353.