

LE ROLE DU MAGNESIUM, DU CALCIUM ET DU ZINC DANS LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Raffaele DE NICOLA e Graeme WALKER

School of Contemporary Sciences, University of Abertay Dundee, Dundee, Ecosse

Rapport présenté lors du séminaire « Gestion adaptée de la fermentation alcoolique aux vins de Toscane et résultats du projet GEFERTO », San Casciano V.P. (FI), 18 juin 2004.

Introduction

La réponse physiologique d'une levure, dans un milieu de culture déterminé, repose sur plusieurs facteurs : le patrimoine génétique de cette levure, les conditions physiques du milieu de culture (pH, température) et la disponibilité en substances nutritives.

Les milieux utilisés pour la fermentation alcoolique, comme le moût de raisin, le moût de malt et la mélasse, sont riches en sucres, acides aminés, vitamines et sels inorganiques. Les levures ont besoin d'une variété de ces nutriments pour leur croissance cellulaire et leur métabolisme.

La croissance repose essentiellement sur les procédés industriels dont le but est de maximiser la production de biomasse (comme par exemple les levures starter sèches pour l'œnologie). Le métabolisme concerne au contraire la production des composés caractéristiques de la fermentation (éthanol et de nombreux composés secondaires).

Le magnésium, le calcium et le zinc sont des nutriments inorganiques essentiels, dont la concentration est demandée en milligrammes/litre (pour les ions principaux comme le magnésium) ou en microgrammes/litre (pour les traces d'ions comme le zinc). Malgré leur différence de concentration, ces ions métalliques sont absolument nécessaires au fonctionnement biologique cellulaire des levures.

Tous ces éléments ont une double charge positive (cations divalents). Pendant la fermentation, leur utilisation est souvent influencée par de nombreux facteurs, parmi lesquels la présence de structures chélatantes et absorbantes dans le milieu de culture et celle d'autres ions qui pourraient se révéler antagonistes.

Dans le passé, en œnologie, le rôle des micro-nutriments et des ions en particulier a souvent été sous-estimé. On ne connaît pas encore entièrement le rôle cellulaire des ions métalliques dans les levures œnologiques, ni leur biodisponibilité dans le moût de raisin. Nous retenons que l'optimisation de la biodisponibilité des ions métalliques peut améliorer le rendement de la fermentation des levures dans les procédés industriels. Cet article traite plusieurs problématiques s'intéressant au rôle du magnésium, du calcium et du zinc en œnologie.

Le magnésium

Le magnésium est le cation divalent dont la quantité est la plus grande dans les cellules vivantes, et il est absolument essentiel à la croissance et au métabolisme des levures.

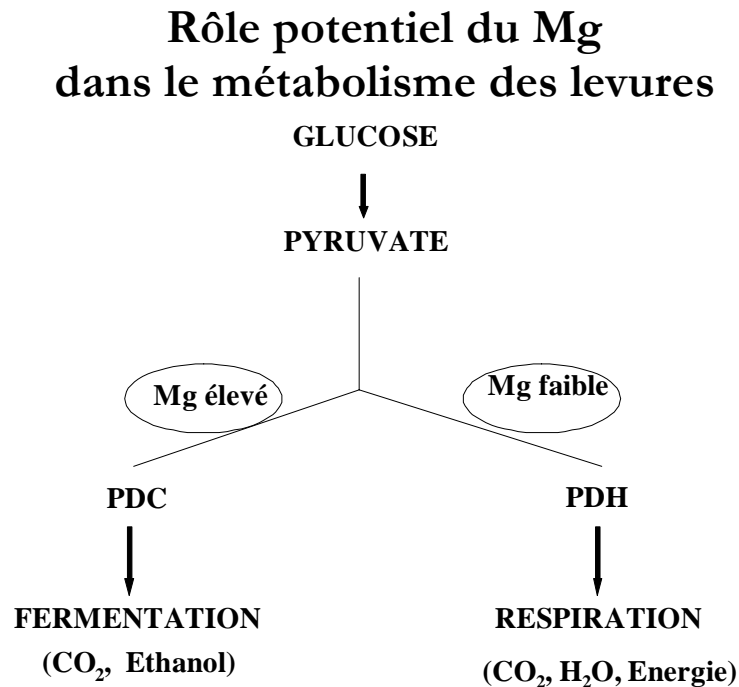
En phase de croissance, le contrôle du magnésium disponible permet de synchroniser la division cellulaire et d'augmenter de la vitesse de croissance (Walker et Duffus, 1980 ; Walker, 1986). Ces découvertes pourraient se révéler significatives pour les entreprises qui s'engagent à augmenter la production de biomasse (et de protéines).

Concernant le métabolisme, le magnésium est un co-facteur pour plus de 300 enzymes ; en phase de fermentation, il stimule les enzymes glycolytiques, dont la pyruvate décarboxylase (PDC), qui favorise la production d'éthanol.

Une déficience en magnésium permet d'activer la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui favorise le métabolisme respiratoire. La figure 1 reprend un modèle de contrôle du métabolisme des levures fondé sur l'altération du magnésium biodisponible (Walker, 1998). Sur le plan des procédés industriels, ce modèle signifie que certains milieux de culture (par exemple les moûts de raisin ou de malt, et la mélasse) pourraient être carencés en ce

précieux élément, et qu'ils pourraient ne pas disposer de niveaux optimaux de production d'éthanol en phase de fermentation.

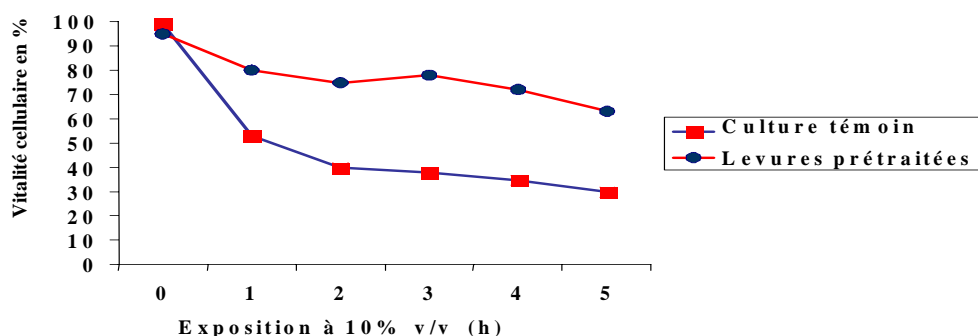
Fig.1



Un ajout contrôlé de magnésium extra-cellulaire (par exemple sous forme de sulfate de magnésium) peut résoudre les problèmes éventuels de carence de cet ion métallique dans le milieu de culture (Walker et al., 1996). Il est aussi possible d'enrichir les cellules en magnésium avant leur absorption dans le milieu de culture en exploitant la capacité des cellules à assimiler cet élément sur une base régulière (Walker et Maynard, 1997 ; Walker et Smith, 1999). Il est important de souligner que le magnésium active les pompes protoniques ATPase de la membrane plasmique (Jones et Greenfield, 1984) et régule le fonctionnement des pompes actives pour le K^+ et le Na^+ , dont l'entrée dans la cellule est ainsi facilitée.

Le magnésium stabilise la membrane cellulaire et neutralise les membranes phospholipidiques (Walker, 1998). Cette propriété explique pourquoi les cellules pré-enrichies en magnésium deviennent plus résistantes au stress éthanol (figure 2) et au stress des hautes températures (Birch et Walker, 2000). Au cours des procédés industriels, ces stress peuvent facilement être rencontrés. Des traitements à base de magnésium pourraient s'avérer plus avantageux sur le plan économique que d'autres solutions technologiques destinées à minimiser le stress physiologique auquel les levures sont exposées.

Protection des levures contre le stress éthanol par un prétraitement de la culture au Mg



La demande cellulaire des ions Mg se situe entre 50 et 100 mg/l, et leur concentration dans les moûts de raisin peut varier entre 40 et 160 mg/l (Cabanis et Flanzky, 1999). Malheureusement, le magnésium présent dans les milieux de fermentation comme le moût de raisin pourrait ne pas toujours être biodisponible. Par exemple, il pourrait être complété par des acides aminés et des agents chélatants présents dans le milieu, mais les levures ne seraient pas en mesure de le faire passer à travers la membrane cellulaire. Une fois que la plus grosse partie du magnésium est associée à la cellule, il n'est plus disponible pour le fonctionnement cellulaire car il est lié à des groupes non spécifiques de la paroi cellulaire (Walker, 1978 ; Saltukoglu et Slaughter, 1983).

En outre, d'autres ions, dont le calcium, lorsque présents en forte concentration, pourraient interférer avec l'absorption et l'utilisation du magnésium.

Le calcium

Le calcium joue un rôle fondamental dans les fonctions cellulaires, mais avec des valeurs intercellulaires très basses. En effet, les cellules de levure se multiplient très bien dans des milieux dont la concentration en calcium est très basse. Il se fixe solidement aux parois des cellules de levure, et joue plusieurs rôles dans les interactions cellules-cellules (par exemple dans la floculation) et dans la séparation de la cellule fille pendant le processus de germination (Anraku et al., 1991).

La levure *saccharomyces cerevisiae* a tendance à exclure activement le calcium de la cellule (Helin et Slaughter, 1977). Le manganèse peut remplacer le calcium et s'avère 500 fois plus efficace pour favoriser le processus du cycle cellulaire (Louking et Kung, 1995).

La concentration optimale de calcium pour la multiplication cellulaire des levures se situe entre 20 et 200 mg/l, mais l'on suppose que cette valeur est bien moindre pour la levure *saccharomyces cerevisiae* (Jones et Greenfield, 1984). Néanmoins, pour la plupart des milieux de culture tels que la mélasse et les moûts de raisin, sa concentration est beaucoup plus élevée (Walker, 1994). Cette situation pourrait entraîner de sérieux problèmes de croissance cellulaire et de fermentation (Tajima et al., 1996), essentiellement en raison de son antagonisme avec le magnésium.

Antagonisme entre le magnésium et le calcium

L'antagonisme biochimique entre le magnésium et le calcium est bien connu. En raison de sa nature chimique et de son nombre plus élevé de coordinations, le calcium a une aptitude plus grande que le magnésium à se lier aux protéines et à d'autres composés. C'est la raison principale pour laquelle le calcium se substitue au magnésium (Williams, 1974). Il empêche le transport de la membrane du magnésium et le fonctionnement de la magnésium ATPase qui en dépend, en diminuant radicalement l'apport des nutriments.

Une corrélation positive entre les cellules mortes et de hautes concentrations en calcium a été établie. En revanche, cette corrélation est négative pour le magnésium. Le rapport cellulaire optimal entre calcium et magnésium est de 1/30, et il est clair que le respect de ce rapport, même dans des milieux de culture, peut favoriser la multiplication cellulaire des levures et améliorer les procédés de fermentation (tableau 1).

Le moût de raisin est généralement riche en calcium. Il est possible de réduire le calcium par chélation ou par précipitations chimiques ; il est également possible d'augmenter le rapport magnésium/calcium en ajoutant des sels de magnésium.

	Mg:Ca (rapport)	Ethanol (%v/v)	Différence en %
Moût de raisin normal	0.5:1	7.1	témoin
Moût enrichi en Mg	10.7:1	8.7	+1.6
Moût appauvri en Mg	0.06:1	4.8	-2.3

Tab. 1 Rapport entre magnésium et calcium et taux de fermentation.

Le zinc

Le zinc est un élément trace essentiel qui active de nombreuses enzymes, parmi lesquelles la phosphatase acide et alcaline, l'aldolase, la triphosphate déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase (ADH). Cette dernière enzyme permet la conversion de l'acétaldéhyde en éthanol à la fin du processus de fermentation.

Le zinc favorise la biosynthèse de la riboflavine et stimule l'absorption de certains sucres dont le maltose et le maltotriose (Jones et Gadd, 1990).

Il ne remplit pas seulement des fonctions métaboliques, il agit également comme un agent stabilisateur de la membrane cellulaire. Les levures absorbent très rapidement le zinc du milieu de culture, et tout le zinc disparaît complètement en une heure (figure 3). Ce phénomène d'absorption rapide et complète du zinc a été observé (De Nicola, non publié) dans de nombreuses souches industrielles de *Saccharomyces cerevisiae*, et dans différents milieux de culture de fermentation comme le moût de raisin, le moût de malt et la mélasse de canne à sucre. L'absorption révèle un caractère thermo-dépendant et actif sur le plan métabolique, mais elle n'est pas liée à la synthèse *ex novo* des protéines (De Nicola et Walker, non publié).

Le zinc est rapidement transféré et s'accumule à l'intérieur de la vacuole. Cette situation a été appelée précédemment « zinc-shock » (Mac Diarmid et al., 2003).

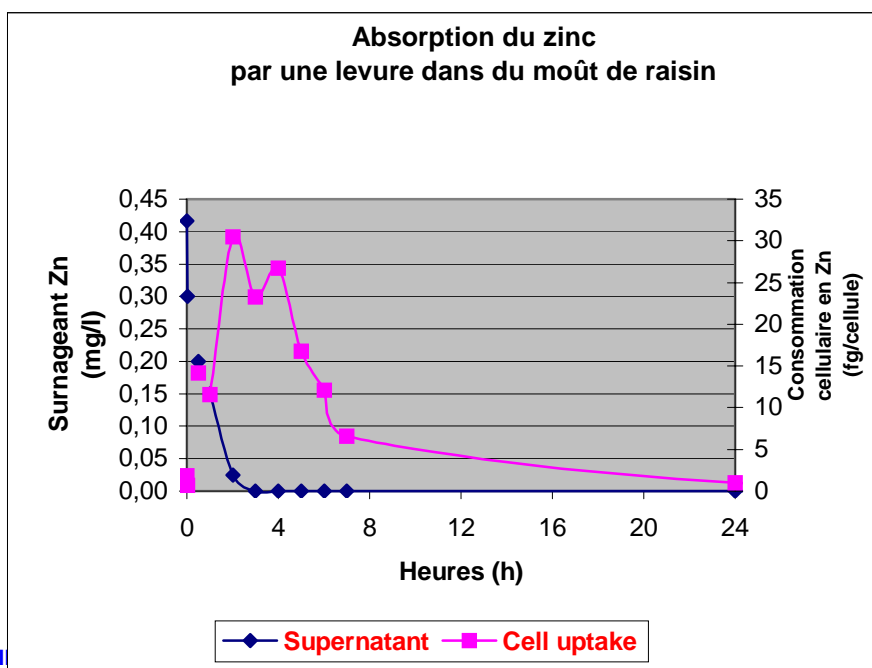


Fig. 3 Une levure oenologique a été cultivée dans du jus de raisin, en erlenmeyers maintenus en agitation à 25°C. Des échantillons de cellules ont été prélevés à intervalles réguliers, centrifugés, lavés à l'eau déionisée, exposés à de l'acide nitrique et analysés pour leur contenu en zinc par Spectrophotométrie à absorption atomique (SAA).

Certaines expériences de micro-fermentation avec des levures de vin dans du jus de raisin présentant des concentrations croissantes de zinc (jusqu'à 26,5 mg/l à la fin) ont montré que la vitalité des cellules et le rendement en alcool restent presque identiques.

Les tests de micro-vinification ont été effectués dans des fermenteurs coniques Imhoff (1 litre, angle du cône de 74°). Le jus de raisin avec des concentrations croissantes de zinc (ajouté sous la forme de zinc acétate) a étéensemencé à raison de 10^7 cellules/mL. La fermentation a été suivie pendant cinq jours, et des échantillons de cellules ont été prélevés quotidiennement et leur vitalité, leur nombre et leur teneur en zinc ont été analysés. Simultanément, le surnageant a été analysé pour le zinc, l'éthanol et les concentrations en sucre.

Une fois le rendement d'éthanol le plus élevé atteint, les cellules libèrent du zinc dans le milieu de culture. Nous supposons que cette réaction est liée au stress éthanol auquel les levures sont soumises au cours de la dernière phase de fermentation (fig. 4, 5 et 6).

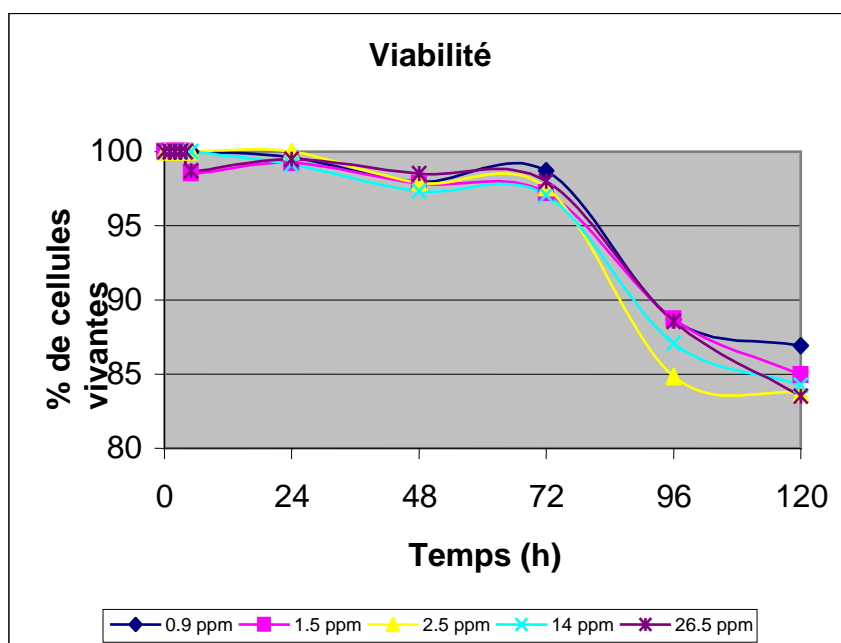


Fig. 4 et 5
A des concentrations croissantes de zinc, la vitalité et la capacité de fermentation restent presque identiques.

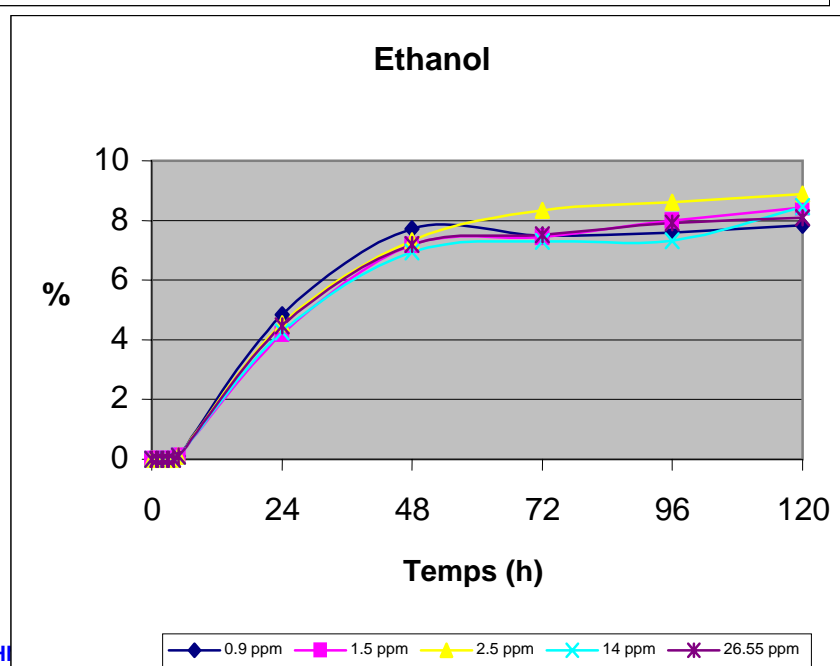
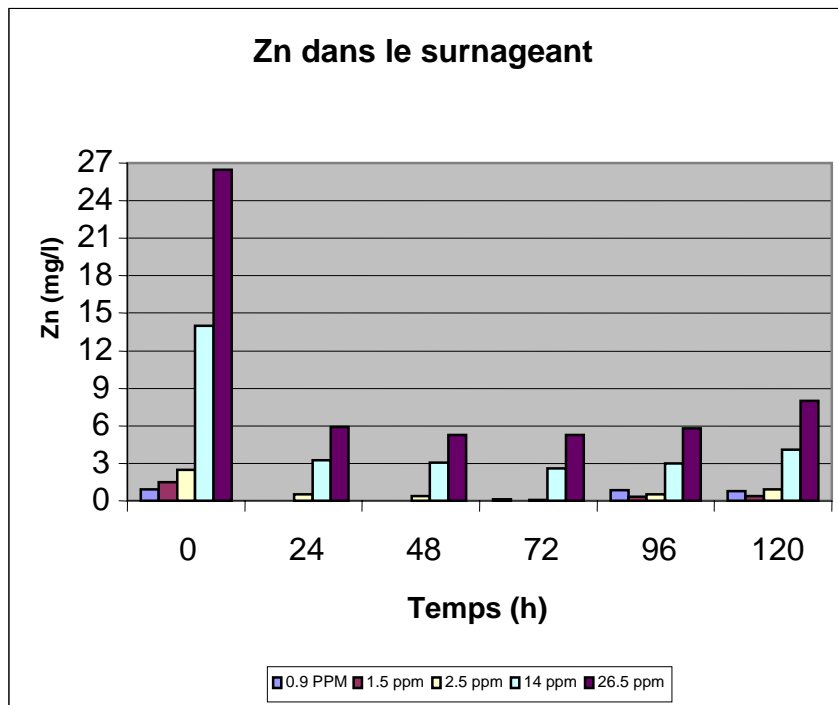


Fig. 6

Après 48 heures, lorsque le niveau d'éthanol a atteint sa plus grande valeur, les cellules ont libéré des ions de zinc dans le milieu de fermentation, dans tous les fermenteurs.



La concentration optimale de zinc est variable selon la souche.

En général, les niveaux optimaux pour la multiplication sont compris entre 0,25 et 0,50 mg/l et entre 1 et 2 mg/l pour la glycolyse (Jones et Greenfield, 1984). Dans le moût de raisin, le niveau de concentration varie entre 0,04 à 7,8 mg/l, et la moyenne s'élève à 0,9 mg/l (Cabanis et Flanzy, 1999).

Une carence en cet élément pendant la fermentation peut entraîner de sérieux problèmes d'affaiblissement de la croissance cellulaire pendant la phase de propagation, ainsi qu'une production réduite d'alcool. Par conséquent, la fermentation se déroule très lentement.

A l'inverse, un excès de zinc pourrait être toxique, mais cela dépend surtout de la présence de manganèse. Si le taux de manganèse est inférieur à 0,4 mg/l, la tolérance maximale en zinc s'élève à 0,2 mg/l. Si le taux de manganèse est supérieur à 0,4 mg/l, le niveau de zinc toléré peut atteindre 65,5 mg/l maximum (Jones et Greenfield, 1984).

Les cellules intoxiquées par le zinc produisent moins d'éthanol, présentent une baisse consistante de vitalité et ont une capacité moindre à absorber les sucres de fermentation.

Pour expliquer les effets toxiques du zinc, Rees et Stewart (1998) ont supposé l'activation d'enzymes de dégradation, la dénaturation et l'inhibition du fonctionnement de certaines enzymes, le soutien de l'autolyse cellulaire et l'inhibition des systèmes de transport des ions et des nutriments.

Conclusion

Nos résultats montrent que le magnésium, le calcium et le zinc jouent tous des rôles importants dans la physiologie des levures. Une gestion adaptée de leurs concentrations dans les procédés de fermentation industrielle, avec pour objectif de maîtriser leur biodisponibilité, pourrait être bénéfique pour la multiplication et la vitalité cellulaire, l'efficacité de la fermentation et la résistance aux stress liés à l'environnement. Par conséquent, en

oenologie, afin d'assurer une fermentation de qualité optimale, nous vous suggérons un plus grand contrôle des taux d'ions métalliques présents dans le moût.

Bibliographie

- Anraku, Y., Ohya Y. & Iida, H (1991) Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1093: 2/3: 169-177.
- Birch, R.M. and Walker, G.M. (2000) Influence of Magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme & Microbial Technology*, 26: 678-687.
- Cabanis, J.-C. and Flanzy, C. (1998) Acides organiques, substances minérales, vitamines, lipides. *Oenologie, fondements scientifiques technologiques*. Coordonnateur Claude Flanzy, Ed. Lavoisier, Partie I, Chap. 1, 4-39.
- Helin, T.R.M. and Slaughter J.C. (1977) Minimum requirements for zinc and manganese in brewer's wort. *Journal of the Institute of Brewing*, 83: 17-19.
- Loukin, S. & Kung, C. (1995) Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. *Journal of cell Biology*, 131(4):1025-1037.
- Jones, R.P. & Gadd, G.M. (1990) Ionic nutrition of yeast-physiological mechanism involved and implications for biotechnology *Enzyme Microbial Technology* 12: 402-418.
- Jones, R.P. and Greenfield, P.F. (1984) A review of yeast ionic nutrition. Part I: growth and fermentation requirements, *Process biochemistry*, april, 48-60.
- MacDiarmid, C. W., Milanick, M.A. and Eide, D. J. 2003. Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (17): 15065-15072.
- Rees, E.M.R. and Stewart, G.G. (1998) Strain specific response of brewer's yeast strains to zinc concentrations in conventional and high gravity worts *Journal of the Institute of Brewing*, 104: 221-228.
- Saltukoglu, A. and Slaughter, J.C. (1983) The effect of magnesium and calcium on yeast growth *Journal of the Institute of brewing*, 89, 81-83.
- Tajima, K., Yoshizumi, H. & Terashima, Y. (1966) Salt and sugar tolerances of yeast on alcoholic fermentation. 1. The inhibition of fermentation by the highly concentrated salts in molasses. *Journal of Fermentation Technology*, 44: 77-84.
- Walker, G.M. (1978) Metal ions and the control of the cell cycle in fission and budding yeasts, unpublished PhD thesis, Heriot Watt University, Edimburgh.
- Walker, G.M. (1986) Magnesium and cell cycle control – an update. *Magnesium*, 5, 9-23.
- Walker, G.M. (1998) Magnesium as a stress-protectant for industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of American Society of Brewing Chemist*. 56, 109-113.
- Walker, G.M., Birch, R.M., Chandrasena, G, and Maynard, A.I. (1996) Magnesium, calcium and fermentative metabolism in industrial yeasts. *Journal of American Society of Brewing Chemist*. 54, 13-18.
- Walker, G.M. and Duffus, J.H. (1980) Magnesium and control of the cell cycle in yeast, *Journal of cell science*, 42, 329-356.
- Walker, G.M. and Maynard, A.I. (1996) Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme & Microbial Technology*, 18: 455-459.
- Walker, G.M. and Smith, G.D. (1999) Metal ion preconditioning of brewer's yeast. In: *Proceedings of the Fifth Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*. Ed.I.Campbell. Institute of Brewing, London pp. 311-315.
- Williams, R.J.P. (1974) calcium ions: Their ligands and their functions. *Biochemical Society Symposium*, 39: 133-138.