

## ARRETS DE FERMENTATION ET FERMENTATIONS LANGUISSANTES

Linda F. Bisson

Department of Viticulture and Enology  
University of California, Davis – Etats-Unis

### Résumé

Les levures *Saccharomyces* ont progressivement été amenées à utiliser efficacement le sucre. A l'issue de la fermentation alcoolique du jus de raisin, il reste habituellement moins de 0,1 % de sucre. Les arrêts de fermentation surviennent lorsque les levures interrompent prématurément le métabolisme du sucre, laissant ainsi une concentration plus élevée que ce qui est attendu et considéré comme normal pour parler de fermentation « complète » à un niveau commercial. Les fermentations languissantes se caractérisent par une durée anormalement longue pour arriver leur terme, de l'ordre de plusieurs mois au lieu de deux à trois semaines. De nombreuses causes d'arrêts de fermentation et de fermentations languissantes sont connues. De telles fermentations sont difficiles à traiter, car elles ne sont généralement pas identifiées jusqu'à ce que l'arrêt se produise. L'arrêt de fermentation constitue une réponse des levures au stress de l'environnement. Les choix de traitement ont généralement des effets sur les caractéristiques du vin et nuisent à sa qualité. Pour ces raisons, les vinificateurs souhaiteraient réduire ou éliminer l'incidence de l'arrêt de fermentation.

### Introduction

Il existe de nombreuses causes aux arrêts de fermentation et aux fermentations languissantes dans le vin. Certaines de ces causes sont rares et propres à des régions de production spécifiques, alors que d'autres sont plus universelles. Bien entendu, il est important de comprendre les raisons qui ont entraîné un problème de fermentation, afin d'y remédier et de pouvoir l'éviter à l'avenir. Il est nécessaire de rectifier certaines idées fausses au sujet des arrêts de fermentation. De nombreux vinificateurs ainsi que certains chercheurs croient que la fermentation s'arrête en raison de la mort d'un grand nombre de cellules dans la culture. Bien que cette perte de viabilité entraîne effectivement une diminution de la capacité fermentaire, ce phénomène n'en demeure pas moins rare en conditions de production. Nos travaux, ainsi que ceux d'autres chercheurs, laissent supposer qu'une telle perte de viabilité n'est pas la cause première des arrêts de fermentation. La viabilité cellulaire reste importante dans les fermentations arrêtées dans des conditions du type de celles rencontrées en Californie, alors que la consommation des sucres a cessé. Il faut d'ailleurs indiquer qu'en fait, la consommation des sucres continue, mais à un taux bien inférieur.

L'arrêt de fermentation est un processus adaptatif. Il a été démontré que dans des conditions de stress, les cellules renouvellent ou altèrent les protéines transporteuses d'hexose, et perdent ainsi leur aptitude à fermenter le sucre [43, 48, 64]. En d'autres termes, le redémarrage de la fermentation va nécessiter une nouvelle synthèse protéique, qui n'aura vraisemblablement pas lieu en raison des concentrations élevées en éthanol typiquement liées aux arrêts de fermentation. La nature même de la glycolyse rend la consommation non régulée des sucres nuisible à la viabilité cellulaire. L'énergie est consommée au cours de la première phase de la glycolyse, c'est-à-dire quand les premières réactions phosphorylent les hexoses en produisant du fructose-1,6-diphosphate. L'énergie nette n'est pas produite avant la dernière réaction du déroulement de la glycolyse, c'est-à-dire la réaction de la pyruvate kinase qui transforme le phosphoenol pyruvate en pyruvate en produisant une molécule d'ATP (l'Adénosine Tri-Phosphate). Si les réactions de la première phase de la glycolyse se détachent de celles de la dernière phase, un appauvrissement en ATP peut néanmoins survenir. Des ressources énergétiques réduites nuisent à la capacité de la cellule à maintenir sa viabilité. Puisque la toute première réaction catalysée par l'hexokinase consomme de l'ATP, la meilleure option pour la cellule pour prévenir un appauvrissement en ATP dans des conditions de stress est de réguler vers le bas le processus de consommation

des sucres [6, 59, 66]. Par conséquent, si la progression par glycolyse est bloquée ou que la demande en ATP cellulaire augmente, le transport des sucres sera réduit et les cellules entreront dans un « état de maintien ». Si les conditions sont suffisamment sérieuses, le renouvellement des transporteurs de sucres dans la membrane sera considérable, ce qui protégera les cellules d'une consommation excessive en glucose et d'un éventuel appauvrissement en ATP. Cela permet également à la quantité d'ATP présente d'être utilisée pour réparer les dommages causés par le stress. La vitesse de catabolisme des sucres diminue au niveau requis pour garantir le maintien des niveaux énergétiques

Dans les levures, la synthèse de la nouvelle paroi cellulaire et de la membrane se produit à l'endroit du bourgeonnement. Cela signifie que les cellules qui ne se développent pas ont une capacité limitée à insérer de nouvelles protéines dans leurs membranes plasmiques. Une fois que les cellules se sont adaptées aux conditions de stress par la dégradation de leurs protéines transporteuses, elles ne retrouveront leur capacité à cataboliser rapidement les sucres que si elles se trouvent de nouveau dans des conditions de croissance. Agir uniquement sur la cause du stress peut ne pas suffire pour faire redémarrer la fermentation. Cela est particulièrement vrai lorsque les taux d'éthanol sont suffisamment élevés pour limiter la croissance (au-delà de 10 %). Les cellules ne se développeront à nouveau que lorsque les taux d'éthanol auront diminué. Si l'arrêt de fermentation se produit à un taux élevé d'éthanol, la meilleure option pour le vinificateur est alors d'inoculer une nouvelle souche adaptée à des taux d'éthanol supérieurs et à forte capacité fermentaire.

### **Capacité Fermentaire n des Levures**

La vitesse de fermentation des sucres dépend de deux facteurs : la concentration de biomasse totale de levures et la capacité fermentaire des cellules individuellement. La densité cellulaire finale d'une fermentation typique s'élève environ à  $10^8$  cellules/ml. S'il est impossible de parvenir à ce niveau de biomasse en raison de limitations nutritionnelles, la fermentation sera naturellement plus lente car le milieu présentera un nombre plus faible de cellules en fermentation. Certaines fermentations languissantes ne sont dues qu'à des densités de biomasse faibles. La capacité de fermentation des cellules individuelles est également un facteur de fermentation languissante. La capacité de fermentation par cellule diffère selon les souches de levure, et également selon les conditions de multiplication. Certaines souches ont tendance à être des fermenteurs plus lents que d'autres. Cela n'implique pas que les fermentations s'arrêteront, mais simplement que le temps de séchage sera différent. Nous avons trouvé que dans des conditions optimales, avec teneur nutritionnelle excessive, températures et pH modérés, aération et remuage adapté, les différences de capacité fermentaires des souches diminuent. Ces différences sont plus prononcées en conditions de stress, suggérant ainsi des différences d'adaptation des souches à l'environnement, ce qui est corroboré par les données du transcriptome[28]. Les besoins nutritionnels des souches varient également. En raison de ces grandes différences entre les souches, il est important pour les caves de comprendre le comportement fermentaire des souches qu'ils utilisent. Une identification et un diagnostic précis du problème de fermentation reposent sur la compréhension approfondie de la définition d'un profil normal de fermentation. Certaines souches ont été identifiées comme permettant de relancer efficacement les fermentations arrêtées [16].

### **Besoins Nutritionnels des Levures**

Une fermentation alcoolique typique peut être divisée en deux phases distinctes (Figure 1) [8].

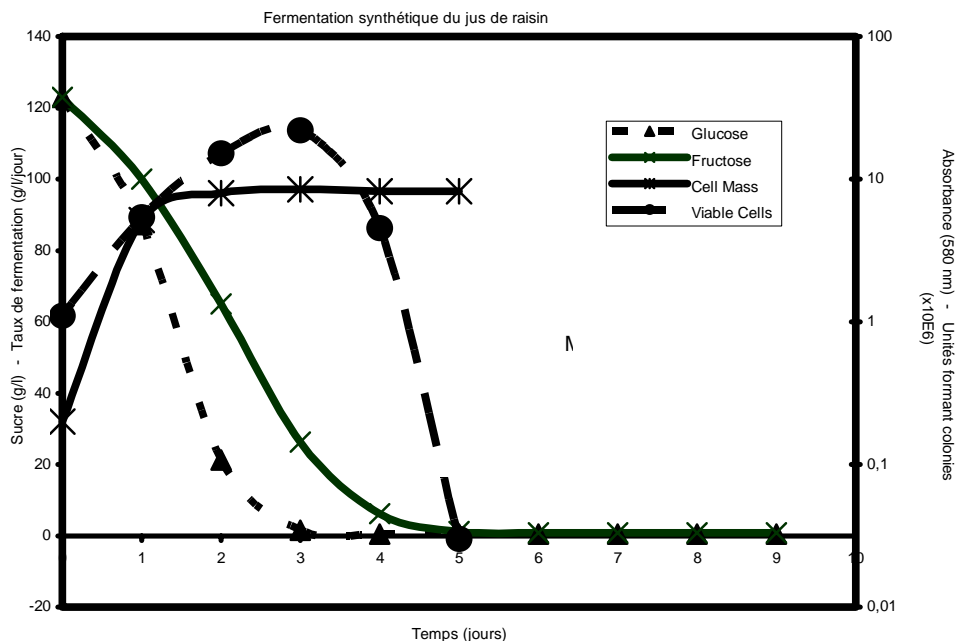


Figure 1. Profils des levures et de la fermentation du jus de raisin.

Il y a d'abord une phase de latence, basée sur la multiplication cellulaire, au cours de laquelle les cellules adaptent leur métabolisme aux nouvelles conditions de multiplication. Cette phase initiale est ensuite suivie par une phase de multiplication exponentielle. Si elle n'est pas limitée par les conditions du milieu, la croissance se poursuivra jusqu'à ce que la densité cellulaire finale soit atteinte. Il s'agit de la concentration maximale de cellules admissibles dans le milieu. Une fois cette valeur atteinte, il n'y aura pas de nouvelle multiplication nette avant que le nombre de cellules ne diminue. Le nombre de cellules peut diminuer au cours de la fermentation en raison de la sédimentation des cellules de levure. La multiplication peut reprendre dès que la concentration de cellules en suspension a suffisamment diminué. Pour les fermentations de jus de raisin, la densité cellulaire finale est atteinte à un taux de  $1-2 \times 10^8$  cellules/ml. Les cellules plus anciennes ou celles qui ont une capacité de fermentation réduite sédimenteront dès la phase de fermentation. Bien que le nombre exact de cellules minimal auquel une nouvelle phase de multiplication se déclenche ne soit pas connu, un nombre situé entre  $10^7$  et  $10^8$  cellules/ml a été observé dans le jus de raisin et la fermentation de moûts. Cette observation suggère que la multiplication cellulaire ne reprend que lorsque la concentration de cellules passe en dessous de  $10^7$  cellules/ml. Si un moût en fermentation active est centrifugé, les cellules restantes reprennent immédiatement leur multiplication, et ce jusqu'à ce qu'un taux de  $10^8$  cellules/ml soit atteint. Ainsi, à ce stade, les cellules sont prêtes à reprendre leur multiplication dès que le nombre de cellules diminue. Cette phase stationnaire initiale est donc due au fait que la densité cellulaire maximale est atteinte, et que les cellules sont encore capables de se reproduire.

A un certain stade de la fermentation, la multiplication nette s'interrompt quel que soit le nombre de cellules. Ce phénomène se produit parce que la concentration d'éthanol atteint un taux qui inhibe la division cellulaire. A ce stade, les cellules ne se multiplient plus mais elles fermentent toujours activement. Le niveau de concentration en éthanol auquel ce phénomène se produit semble dépendre de la souche de levure et varie entre 8 % et 12 % environ. Il a été observé chez certaines souches dont la tolérance à l'éthanol est élevée, une multiplication nette à des degrés d'éthanol encore plus élevés que ce qu'elles supportent normalement. La croissance à des concentrations élevées d'éthanol nécessite réellement la disponibilité de nombreux nutriments. L'éthanol inhibe la consommation d'acides aminés et entraîne un renouvellement de leurs transporteurs [78]. L'arrêt de la multiplication des

levures serait dû à leur incapacité à trouver dans le milieu suffisamment d'azote pour soutenir leur croissance. De nombreux transporteurs d'acides aminés sont des symporteurs de protons, ce qui signifie qu'un proton est absorbé pour chaque molécule d'acide aminé transportée. Les protons doivent ensuite être exclus de la cellule afin d'éviter l'acidification du cytoplasme. L'éthanol entraîne un flux accru de protons passifs dans les cellules. A des concentrations élevées en éthanol, la capacité des cellules à exclure les protons peut atteindre son maximum. Le seul moyen pour la cellule de maintenir sa viabilité est de stopper l'entrée superflue de protons, en inactivant par exemple la consommation en acides aminés. L'éthanol perturbe également les structures cellulaires en déplaçant l'eau d'hydratation. Certains processus tels que la synthèse de l'ADN seraient perturbés si les concentrations en éthanol étaient trop élevées. Par conséquent, la cellule opte pour l'arrêt de sa multiplication afin d'augmenter ses chances de survie dans le milieu. La raison pour laquelle certaines cellules présentent une tolérance plus élevée que d'autres aux effets inhibiteurs de l'éthanol n'est pas encore connue. La tolérance à l'éthanol dépend également de la composition du milieu. Les raisons pour lesquelles et les moyens par lesquels l'éthanol exerce une action inhibitrice sur le processus cellulaire sont connus, mais nous en savons bien moins sur les mécanismes par lesquels les cellules s'adaptent et résistent aux effets inhibiteurs de l'éthanol.

Les besoins nutritionnels pour les cellules en phase de multiplication active et en phase stationnaire sont différents. Il est évident que les cellules en phase de multiplication active ont besoin d'une grande quantité de macronutriments, de suffisamment d'azote, phosphate et sulfate afin de soutenir la synthèse d'une nouvelle cellule, et de sucres disponibles dans le jus en fermentation. Des micronutriments sont également nécessaires. Si des souches commerciales sont utilisées, elles peuvent contenir suffisamment de micronutriments (vitamines et minéraux) pour que plusieurs générations de levures puissent se multiplier. Dans d'autres cas tels que les fermentations avec une flore indigène, la croissance des cellules peut dépendre entièrement des micronutriments contenus dans le jus. L'oxygène stimule la croissance cellulaire et est important pour la synthèse des stérols [4].

Les cellules en phase stationnaire de reproduction ont de la même façon besoin de nutriments alimentant la croissance cellulaire. Au-delà de ce stade, les cellules qui sont inhibées par l'éthanol ont besoin de nutriments qualifiés de « facteurs de survie » qui les aideront à développer et maintenir leur tolérance à l'éthanol [41]. Parmi ces facteurs de survie se trouvent les stérols et les acides gras insaturés qui aident à maintenir la fluidité de la membrane en présence d'un taux d'éthanol perturbant. L'oxygène moléculaire est également considéré comme un facteur de survie car il aide les cellules à maintenir leur tolérance à l'éthanol et permet à la fermentation de se poursuivre. Qualifier ces besoins nutritionnels de « facteurs de survie » est quelque peu incorrect. Il est vrai que ces facteurs sont importants pour la tolérance à l'éthanol mais ils doivent être apportés à la cellule en phase de multiplication active, et ne sont pas tellement efficaces une fois que celle-ci a cessé. Supplémenter de l'oxygène, de l'azote et des acides gras a un effet des plus bénéfiques si cela est effectué pendant que la phase de multiplication des cellules, c'est-à-dire entre 48 et 72 heures de fermentation. Ces éléments sont moins efficaces s'ils sont ajoutés plus tard, vraisemblablement parce que la cellule en a besoin pour mettre en place une composition adaptée de sa membrane. Une fois la multiplication interrompue, seules des modifications limitées de la membrane plasmiques sont possibles. Ainsi, il est important de s'assurer qu'à l'issue de leur phase de multiplication exponentielle, les cellules disposent d'un apport nutritionnel suffisant pour construire des membranes et des organelles tolérantes à l'éthanol.

Outre les phases identifiées à partir du profil de croissance des levures, diverses phases dans le comportement de la fermentation peuvent également être identifiées (Figure 1). La fermentation est initialement ralentie en raison d'une faible population cellulaire. La fermentation est plus rapide une fois que les cellules ont atteint leur densité cellulaire finale.

Le glucose est appauvri plus rapidement que le fructose, si bien que lors des dernières étapes de la fermentation le principal sucre restant est le fructose. La courbe d'appauvrissement en sucre n'est pas linéaire en raison du besoin de synthétiser des transporteurs d'hexose dont les affinités diffèrent. Le transport d'hexose a lieu par diffusion facilitée, et les vitesses de consommation ne sont optimales que lorsque les concentrations en sucre sont à peu près équivalentes au  $K_m$  de l'enzyme. Généralement la consommation sera optimale à des niveaux de substrats dix fois supérieurs ou dix fois inférieurs à la valeur  $K_m$ . La concentration en sucre des moûts en fermentation varie entre un maximum de 1 à 2 M et un minimum de mM, ou un éventail des valeurs des concentrations multiplié par mille. Les transporteurs dont les valeurs  $K_m$  se trouvent dans cette gamme là ont besoin d'être synthétisés au cours de la fermentation. En effet, les levures *Saccharomyces* ont une famille multigène de transporteurs d'hexose, les gènes HXT, avec différentes affinités de substrats, dont l'expression est en grande partie régulée par la concentration d'hexoses dans le milieu [9, 38, 59]. L'échange entre les transporteurs donne un profil de fermentation non linéaire, au sein duquel la cinétique de la consommation change régulièrement. A un moment donné de la fermentation, les cellules vont passer d'un état actif sur le plan métabolique avec une capacité à se multiplier, à un état plus passif. Ce phénomène se traduit sur la courbe de fermentation par un point de transition apparent. Ce point de transition est associé aux niveaux de tolérance à l'éthanol de la souche. Un point de transition précoce pour une souche de levure connue comme tolérante à l'éthanol indique la présence d'un stress dans le milieu menant à une intolérance à l'éthanol.

### **Les Causes des Arrêts de Fermentation**

Le processus de fermentation a été largement étudié pour les levures *Saccharomyces*. Il existe de nombreuses causes d'arrêts de fermentation connues. Le rôle que ces facteurs jouent dans les arrêts de fermentation a été confirmé par des études menées en laboratoire et lors de fermentations de jus de raisin à échelle pilote. Dans la plupart des cas, l'arrêt est provoqué par l'apparition de facteurs de stress au cours de la fermentation. Ces facteurs de stress peuvent être d'ordre physiologique, comme par exemple la limitation nutritionnelle ou l'intolérance à l'éthanol, ou d'ordre environnemental, comme l'exposition à des températures extrêmes ou la compétition avec d'autres microbes. Bien que les causes d'arrêts de fermentation soient connues en grande partie, déterminer la cause dans un cas spécifique peut s'avérer difficile. En effet, en conditions de production, de nombreux facteurs interagissent, et la plupart des études menées en laboratoire se sont concentrées sur une seule variable bien contrôlée. En outre, dans les fermentations de vin se trouve une population mixte d'organismes *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*. Les recherches se sont particulièrement intéressées aux interactions négatives entre ces organismes, mais il est également possible que d'importantes interactions positives existent. Finalement, une étude a montré que des composés phénoliques exerçant une action inhibitrice et une action stimulante étaient présents dans le jus de raisin et qu'ils agissaient à la fois sur la multiplication cellulaire et le métabolisme des levures [11]. Le rôle de ces composés dans la stimulation et l'arrêt de fermentation n'a pas été étudié. Une grande famille de gènes de transporteurs offrant une résistance à plusieurs produits chimiques est présente dans les *Saccharomyces*, ce qui laisse supposer que la consommation et l'excrétion de composés phénoliques pendant la fermentation du raisin forment un processus commun et très régulé [53].

L'achèvement du séquençage du génome des levures *Saccharomyces* a permis de développer une gamme de technologies génomiques permettant d'examiner à la fois l'expression globale du gène et les profils de protéines [63, 67]. Ces technologies ont été appliquées aux levures de vin pendant la fermentation de jus naturels et synthétiques. Bien que différentes souches et jus aient été utilisés lors de ces études, une image uniforme de la physiologie globale des levures a été obtenue. A l'issue de la phase de multiplication exponentielle, de nombreux gènes associés à des réponses au stress sont exprimés dans des souches en laboratoire. L'expression de ces gènes a été qualifiée de réponse générale

au stress [28]. Dans le cas de la fermentation de vin, leur apparition indique une fermentation en progression normale et sans stress. En fait, l'absence d'expression de ces gènes est davantage le diagnostic d'une fermentation à problème, c'est-à-dire qui ne s'adapte pas normalement aux conditions environnementales. Ces études ont également montré qu'il existe des différences entre les souches, et que ces différences influent sur la capacité des levures à mener la fermentation à son terme. Les souches qui, à l'origine, sont plus résistantes au stress ont tendance à avoir des niveaux de base d'expression de certains gènes de réponse au stress général plus élevés. Cela semble ralentir leur multiplication en début de fermentation du vin, mais leur permet de la terminer plus facilement. Dans des fermentations en culture mixte, les souches dont la tolérance au stress est faible semblent avoir l'avantage au début, mais à la fin de la fermentation, elles seront remplacées par les populations plus tolérantes au stress.

*Limitation des nutriments* - La limitation des nutriments est une cause bien connue des fermentations languissantes et des arrêts de fermentation [1, 2, 8, 30, 32, 42]. Les nutriments sont nécessaires au développement d'une quantité de biomasse maximale et au maintien de la capacité fermentaire de ces quantités de biomasse. Dans la plupart des régions viticoles, une supplémentation nutritionnelle est autorisée légalement. Le macronutriment le plus souvent limitant est l'azote, suivi par le phosphate. Très peu d'études considèrent la limitation en sulfate comme une cause réelle de l'arrêt de fermentation, mais cela reste une probabilité. Cependant, puisque l'apport de nutriments est autorisé, le manque de micronutriments n'est plus une cause majeure d'arrêt de fermentation en conditions commerciales.

Il a été démontré récemment qu'un apport en acides aminés spécifiques au cours de fermentation en phase stationnaire prolonge l'activité fermentaire maximale [46]. Des travaux antérieurs semblent indiquer que la supplémentation d'ammonium n'a pas cet effet [42]. Ces études sont généralement menées en mesurant un grand nombre de variables dans de nombreux jus afin d'essayer de mettre en corrélation de manière statistique le profil des acides aminés avec l'arrêt de fermentation. Dans ces cas-là, il n'est pas clairement établi que les faibles taux d'acides aminés provoquent l'arrêt ou bien qu'ils sont eux-mêmes simplement en corrélation avec d'autres facteurs du jus menant à des fermentations languissantes. Ajouter des acides aminés peut favoriser la capacité à synthétiser rapidement les protéines dégradées tels que les transporteurs de glucose. Certains acides aminés sont beaucoup plus efficaces que d'autres ou qu'une association de différents acides aminés [46]. Il est ressorti que l'efficacité des acides aminés n'est pas liée à leur utilisation comme source d'azote pour soutenir la croissance. En effet, l'un des acides aminés les plus efficaces est la glycine [46], une source en azote très pauvre pour les *Saccharomyces*. Cela est toutefois en rapport avec des conclusions indiquant la valeur de stimulation de la supplémentation en glycine dans les fermentations à densité très élevée [79]. Il a été démontré que les besoins en azote pour le maintien d'une fermentation en phase stationnaire sont très différents d'une souche à l'autre, beaucoup plus que les besoins en azote pendant la phase de multiplication [45]. Il a également été démontré récemment qu'en conditions œnologiques, une quantité élevée d'ammonium dans le jus peut inhiber l'utilisation efficace des souches de levure œnologique ainsi que la formation de leur biomasse [65]. De ce fait, les composés contenant de l'azote doivent être équilibrés pour permettre une utilisation et une croissance optimales des levures. De nombreuses études ont souligné l'importance d'un bon apport nutritionnel en azote pour mener une fermentation à son terme dans des conditions œnologiques [1, 7, 30, 50, 51, 61, 62, 68]. Il a enfin été démontré que la limitation en phosphate agit sur la croissance cellulaire et le rendement de biomasse, ainsi que sur la vitesse de fermentation directement [8, 27, 42].

La limitation des micronutriments a également été mise en corrélation avec le phénomène de fermentation languissante. Dans des cas de limitation sévère, si les cellules ont été appauvries en vitamines et co-facteurs, un arrêt de fermentation peut survenir [10, 22]. La limitation en calcium accroît la sensibilité à l'éthanol [52]. Un taux élevé de

manganèse réduit la consommation en magnésium et inversement, si bien qu'une disparité de ces ions peut mener à une situation de carence. Nous avons aussi récemment démontré qu'un déséquilibre entre le pH et les ions potassium peut entraîner un arrêt de fermentation dans des milieux modèles de type jus, et de tels déséquilibres peuvent être présents dans les fruits issus des vignes qui consomment une faible quantité de potassium du sol [39]. Des fermentations languissantes sont également observées dans les jus dont le taux en potassium est élevé. Il se peut que le potassium n'en soit pas lui-même directement la cause, et qu'il s'agisse plutôt d'autres changements dans la composition de la baie survenus à des taux élevés de potassium.

Les levures *Saccharomyces* sont capables de produire toutes les vitamines essentielles sauf la biotine, mais d'après les recherches, la présence d'autres vitamines est un facteur très stimulant pour la croissance et pour la fermentation [42, 50, 54]. Il a été démontré récemment que les levures *Kloeckera apiculata* sont particulièrement efficaces pour extraire la thiamine du jus de raisin en quelques heures, entraînant ainsi une situation de carence pour les *Saccharomyces* [5]. La présence d'acide acétique réduit vraisemblablement la capacité des *Saccharomyces* à transporter et à retenir la thiamine [33]. Ainsi, une cause probable d'arrêt de fermentation alcoolique de vins provenant de jus sans apport de levure sélectionnée, est l'appauvrissement du jus en thiamine par les levures indigènes, entraînant la production d'acides. Ces derniers inhibent le transport des quantités résiduelles de vitamines par les *Saccharomyces*. Le dioxyde de soufre réagit directement avec la thiamine, réduisant ainsi la quantité de cette vitamine.

*La toxicité de l'éthanol et le rôle des facteurs de survie* - La toxicité de l'éthanol est une autre cause majeure des arrêts de fermentation [14, 18, 34, 77, 78]. Il apparaît que l'éthanol agit sur la fluidité de la membrane plasmique de manière complexe. L'éthanol diminue la polarité dans les milieux aqueux mais l'augmente dans les milieux hydrophobiques [15]. La cellule réagit à l'éthanol en produisant une membrane riche en acides gras insaturés et en ergostérols [3, 15, 21, 34, 47, 77]. Cette augmentation en acides gras insaturés et en stérols s'accompagne d'une baisse du contenu protéique dans les membranes tolérantes à l'éthanol. Les changements de composition de la membrane plasmique altéreraient la fluidité de cette membrane pour compenser les effets perturbateurs de l'éthanol sur la fluidité. Néanmoins, cette conclusion a été remise en question récemment [34, 35, 36]. Il a plutôt été avancé que l'éthanol agit sur la fonction de la membrane par interactions polaires, diélectriques et des liaisons hydrogènes, avec les principaux groupes polaires des phospholipides et les protéines intégrales de la membrane, plutôt que de modifier la fluidité de la membrane plasmique [34, 35, 36]. Des changements dans la désaturation des acides gras, une baisse de la teneur en protéines et une augmentation du taux d'ergostérol se produiraient pour contrer les effets perturbateurs de l'éthanol sur les groupes principaux de phospholipides et les protéines, plutôt que d'altérer la fluidité de la membrane du plasma [34, 35, 36]. La sensibilité à l'éthanol est une propriété variable selon les souches de *Saccharomyces*. Cette sensibilité est également affectée par la disponibilité des stérols et des acides gras saturés et insaturés à chaîne longue dans le milieu, car ces composés ne peuvent être synthétisés facilement par les levures dans des conditions anaérobiques [6, 15, 19, 41, 42, 80].

L'acétaldéhyde, précurseur immédiat à l'éthanol en situation de catabolisme, est également toxique [73, 74] et peut se révéler en grande partie responsable de la « sensibilité à l'éthanol » [34, 35]. Les différences de tolérance à l'éthanol selon les souches ont été associées à des concentrations d'acétaldéhyde dans les cellules ; Ce sont les souches dont le taux d'acétaldéhyde cytoplasmique est le plus bas qui tolèrent les taux les plus élevés d'éthanol [34, 35].

*Faible pH* - Les *Saccharomyces* tolèrent des fermentations à faible pH et peuvent facilement se développer dans un jus dont le pH se situe entre 2,8 à 4,2 [8, 29, 42]. A un pH inférieur à 2,8, la croissance et la fermentation sont inhibées. L'éthanol, ainsi que la

tolérance de nombreuses souches aux matières organiques et aux acides gras diminuent lorsque le pH est très faible [55]. Nous avons également constaté que la concentration en potassium est un facteur-clé de la tolérance au pH [39]. Les *Saccharomyces* excrètent des protons au cours de la fermentation et peuvent réduire le pH du milieu de 0,3 unités. Le pH aura aussi des effets très importants sur les types d'espèces bactériennes présentes et leur persistance, ce qui peut agir considérablement sur la progression de la fermentation.

*Températures extrêmes* - L'exposition à des températures extrêmes peut également inhiber la vitesse de fermentation [71, 75]. La membrane plasmique est la principale cible des effets inhibiteurs des températures élevées ou basses [revu aux sections 75, 83]. Puisque l'éthanol et les températures visent la même fonction cellulaire, il n'est pas surprenant que leurs effets soient synergétiques. De brusques variations de températures affectent également l'activité cytoplasmique de l'enzyme, ainsi que la structure et la fonction de l'organelle. Un choc thermique entraîne l'induction de plusieurs protéines liées au stress, qui peuvent aussi être présentes lors de l'entrée en phase stationnaire [17]. La capacité à réagir à de soudaines variations de températures dépend de la capacité à synthétiser les protéines dues au choc thermique. Si le choc thermique se produit dans des conditions de limitation nutritionnelle dans les levures, les cellules peuvent ne pas être capables de compenser la variation de température.

*Les toxines* - Il a également été démontré que plusieurs substances toxiques entraînaient des arrêts de fermentation [2, 8, 42]. Les levures peuvent produire des substances zymotiques plus connues sous le nom de facteurs « killer » [revu à la section 84]. Les levures non-*Saccharomyces* comme l'*Hansenula* et la *Kluyveromyces* produisent des facteurs « killer » qui agissent contre les *Saccharomyces*. Les souches *Saccharomyces* peuvent également produire des facteurs « killer » de glycoprotéines qui sont toxiques pour les souches sensibles de *Saccharomyces* [13, 56]. Les effets des toxines « killer » dépendent de la composition du milieu, et des proportions relatives entre les souches sensibles et les souches produisant des toxines.[49]. Les microorganismes *Bacillus* et *Streptomyces*, habituellement présents dans le sol et qui ont pu être isolés dans les caves, produisent des métabolites qui limitent la multiplication des levures dans des conditions œnologiques [37]. Les moisissures présentes sur le fruit au moment de la récolte peuvent produire des micro-toxines auxquelles les *Saccharomyces* sont sensibles. Que le raisin botrytisé contienne des substances toxiques [42, 60] a été suggéré, mais la nature de ces substances n'a pas été déterminée malgré des efforts considérables de recherche.

Une infestation de moisissures risque davantage d'entraîner un problème de production de composés toxiques par la plante sous forme de champignons, lorsque le fruit est atteint d'une infection aux champignons [76]. Les plantes produisent de nombreux composés (les phytoalexines) et des enzymes (protéines liées à la pathogenèse) en réponse à l'infection, destinés à éliminer l'agent pathogène [44, 72]. Des composés phénoliques toxiques, des analogues d'acides aminés et des enzymes capables de dégrader les parois cellulaires des champignons (chitinases et glucanases) peuvent tous être produits en réaction à une infection. Les phytoalexines sont généralement toxiques et peuvent même réduire la viabilité des cellules de la plante qui les produisent [72]. Il est fort probable que certains de ces facteurs agissent également sur la multiplication des levures et la fermentation, puisque celles-ci appartiennent à la même famille taxonomique que les champignons filamenteux et possèdent une architecture de paroi cellulaire semblable. Les fongicides et les pesticides utilisés dans la vigne peuvent avoir des effets néfastes sur la viabilité des levures, s'ils sont présents à des concentrations résiduelles suffisamment élevées au moment de la récolte [8, 42].

Les acides gras organiques et à chaîne moyenne sont également inhibiteurs pour les *Saccharomyces* [12, 23, 25, 40, 42, 57, 58, 81, 82]. Les bactéries et les levures non-*Saccharomyces* peuvent produire ces composés, mais elles peuvent aussi être formées par



les *Saccharomyces* [25, 58]. Les fermentations en culture mixte (les levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* et les bactéries) augmentent le risque d'apparition de ce type d'inhibition. Tel que mentionné précédemment, ces acides sont plus toxiques à des niveaux élevés d'éthanol et des températures extrêmes [82], et peuvent avoir des effets sur l'absorption et la rétention de vitamines [33], affectant ainsi la fermentation par *Saccharomyces*.

*Incompatibilité microbienne* – Les fermentations œnologiques contenant des populations initiales élevées de levures non-*Saccharomyces* et de bactéries sont très susceptibles de devenir languissantes ou de subir un arrêt [8, 23, 24, 25, 42]. Ce risque est dû en partie à la compétition pour les nutriments entre les microorganismes et à la production de substances toxiques tel que décrit plus haut. En revanche, d'autres facteurs, tels qu'une densité cellulaire totale élevée, peuvent également jouer un rôle important dans le ralentissement de la vitesse de fermentation. Nous-mêmes, ainsi que d'autres chercheurs, avons découvert que les fermentations en culture mixte (*Saccharomyces* et bactéries) nécessitent une supplémentation de vitamines plus élevée que la normale, et qu'une fermentation arrêtée peut ne pas être redémarrée jusqu'à ce que la biomasse existante soit éliminée par soutirage ou centrifugation [T. Rynders et L.F. Bisson, observations non publiées]. Il est également important de souligner qu'il existe des associations incompatibles entre des levures de vin et des bactéries malolactiques (ML). La bactérie *Lactobacillus kunkeei*, connue sous le nom de « *Lactobacillus féroce* », provoque fréquemment des arrêts de fermentation, quelles que soient la ou les souches de levures présentes [24, 26].

*Pratiques œnologiques* - Plusieurs pratiques œnologiques peuvent diminuer ou accroître l'incidence de l'arrêt de fermentation [2, 8]. Une clarification excessive des moûts réduit la vitesse de fermentation. Cela est apparemment dû à de multiples facteurs : la perte en nutriments retrouvés dans les particules telles que les acides gras insaturés et les stérols [20, 21, 31, 42], la diminution en vitamines et en minéraux par élimination des microbes qui ont séquestré ces composants [5], ainsi qu'une diminution de la capacité naturelle d'agitation du moût [bisrev]. Les études semblent également indiquer que les matières solides du moût servent de sites de nucléation pour la libération de CO<sub>2</sub>, et peuvent constituer une surface solide sur laquelle les levures peuvent former un biofilm. Un usage excessif du dioxyde de soufre peut aussi entraîner une vitesse de fermentation ralentie, selon le pH du milieu et les concentrations liées et libres du composé [8]. Les pratiques en cave, telles que l'ajout de nutriments et l'aération, peuvent avoir des effets positifs sur le déroulement de la fermentation et réduire l'incidence des arrêts de fermentation et des fermentations languissantes [2, 8, 42]. Enfin, le moyen utilisé pour contrôler la température peut jouer un rôle majeur dans les problèmes de fermentation. Un écart trop important ou trop faible entre le système de refroidissement et la température désirée du moût peut entraîner une fermentation languissante voire même la mort des levures [8].

*Autres facteurs* - Plusieurs autres facteurs pouvant agir sur la vitesse de fermentation ont été moins bien cernés. Une forte concentration en fructose par rapport au glucose serait inhibiteur pour les levures [69, 70]. Les fortes concentrations résiduelles de fructose peuvent être un symptôme plutôt qu'une cause des arrêts de fermentation et des fermentations languissantes. Schütz et Gafner [70] ont avancé la théorie selon laquelle une utilisation réduite du fructose et une tendance à procéder à des collages pendant la fermentation sont associées à un taux d'activité hexokinase I réduit. Il a toutefois été démontré que l'ajout de fructose et la variation corollaire du rapport glucose/fructose (F/G) peuvent inhiber une fermentation en cours [69], alors que l'ajout de glucose pour ramener ce F/G en dessous de 0,1 peut stimuler l'activité fermentaire. Cela est-il dû ou non à l'inhibition par le substrat du processus de transport ? Cela n'a pas encore été clairement démontré.

Les effets des enzymes du moût de raisin sur la progression de la fermentation restent en grande partie méconnus. Les taux de polyphénol oxydase varient considérablement selon le cépage et l'année [8]. Cette enzyme entre directement en

compétition avec les *Saccharomyces* pour l'oxygène dissous disponible. La véritable raison pour laquelle le SO<sub>2</sub> est capable de stimuler la fermentation par *Saccharomyces* résiderait dans l'inhibition du polyphénol oxydase en compétition, rendant ainsi l'oxygène plus facilement disponible pour les *Saccharomyces* [bisrev], et non dans l'inhibition de levures indigènes (non-*Saccharomyces*) et de bactéries.

Des vinificateurs ont parfois remarqué que suivant leur localisation, certains vignobles produisaient un raisin présentant un risque élevé de fermentations languissantes, même lorsque des nutriments étaient ajoutés au moût. Cela est peut-être dû à une pression de la maladie particulièrement élevée sur ces vignes et à la teneur en phytoalexines qui en résulte dans le jus. Il se peut aussi que ces raisins renferment des populations importantes de flore indigène. Nous avons récemment démontré que les composés phénoliques du raisin peuvent stimuler ou inhiber les vitesses de fermentation, selon la concentration et la spécificité du composé [R. Hood et L.F. Bisson, observations non publiées]. Les effets biologiques des composés phénoliques du raisin sur les levures n'ont pas été étudiés de manière approfondie. Cantarelli a pu observer des effets à la fois inhibiteurs et stimulateurs des composés phénoliques du raisin sur les vitesses de fermentation et sur la multiplication des levures [11]. Les fermentations languissantes peuvent survenir en raison d'une déficience des composés phénoliques stimulateurs ou d'un excès de composés phénoliques inhibiteurs. Les différences de composition phénolique peuvent être l'une des raisons pour lesquelles les raisins de certains vignobles semblent prédisposés à des problèmes de fermentation.

### **Conclusion**

Il a été démontré que de nombreux facteurs entraînent des fermentations œnologiques lentes ou incomplètes. Bien qu'il puisse être difficile de déterminer la cause précise d'un arrêt de fermentation ou d'une fermentation languissante, connaître le type d'arrêt de fermentation peut se révéler vraiment utile pour limiter le nombre de possibilités. Une attention particulière au nombre de cellules viables de *Saccharomyces*, une utilisation judicieuse du refroidissement et du maintien de la température, associées à un dosage prudent de la supplémentation en nutriments, devraient réduire considérablement l'incidence des fermentations lentes et incomplètes. Des questions subsistent pour certains cas d'arrêt de fermentation, dont la cause n'est pas connue. Des outils de prévision sont actuellement en cours de développement afin de permettre aux vinificateurs d'amener leurs fermentations à leur terme.

Article publié dans le cadre de la formation *Tópicos de Actualización en Viticultura y Enología* (CEVIUC), tenue les 22 et 23 juillet 2004, à Santiago de Chile, Chili.

### Ouvrages cités

1. Agenbach, W. A. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. pp 66-88 *In* Proceedings of the South African Society for Enology and Viticulture, Stellenbosch: South African Society of Enology and Viticulture, Cape Town. (1977).
2. Alexandre, H., and C. Charpentier. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 20:20-27 (1998).
3. Alexandre, H., I. Rousseaux, and C. Charpentier. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Letts.* 124:17-22 (1994).
4. Aries, V., and B. H. Kirsop. Sterol biosynthesis by strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence and absence of dissolved oxygen. *J. Inst. Brew.* 84:118-122 (1978).
5. Bataillon, M., A. Rico, J.-M. Sablayrolles, J. M. Salmon, and P. Barre. Early thiamine assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferm. Bioeng.* 82:145-150 (1996).
6. Becker, J.-U., and A. Betz. Membrane transport as controlling pacemaker of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 274:584-597 (1972).
7. Bely, M., J.-M. Sablayrolles, and P. Barre. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 70:246-252 (1990).
8. Bisson, L. F. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:107-119 (1999).
9. Bisson, L. F., D. M. Coons, A. L. Kruckeberg, and D. A. Lewis. Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28:259-308 (1993).
10. Blackwell, K. J., J. M. Tobin, and S. V. Avery. Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 47:180-184 (1997).
11. Cantarelli, C. Phenolics and yeast: Remarks concerning fermented beverages. pp S53-S51 *In* Proceedings of the Seventh International Symposium on Yeasts, A. Martini and A. Vaughan-Martini (eds.). John Wiley and Sons, Ltd., New York. (1989).
12. Cardoso, H., and C. Leao. Mechanisms underlying the low and high enthalpy death induced by short chain monocarboxylic acids and ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Micro. Biotechnol.* 38:388-392 (1992).
13. Carrau, F. M., E. Neirotti, and O. Gioia. Stuck wine fermentations: Effect of killer/sensitive yeast interactions. *J. Ferm. Bioeng.* 76:67-69 (1993).
14. Casey, G. P., and W. M. Ingledew. Reevaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewers yeast. *Am. Brew. Soc. Chem.* 43:75-83 (1985).
15. Ciesarova, Z., J. Sajbidor, D. Smogrovicova, and P. Bafrcova. Effect of ethanol on fermentation and lipid composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Biotech.* 10:1-12 (1996).
16. Colas, S. Une nouvelle levure seche active pour les reprises de fermentation alcoolique: RhoneL4473. *Guide de la Vinification Rhodoniene* 3:39-40.
17. Craig, E. A. The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. pp 501-537 *In* The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression, E. W. Jones, J. R. Pringle, and J. R. Broach (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. (1992).
18. D'Amore, T., and G. G. Stewart. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme. Microbiol. Technol.* 9:322-330 (1987).

19. David, M. H., and B. H. Kirsop. A correlation between oxygen requirements and the products of sterol synthesis in strain *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 77:527-531 (1973).
20. Delfini, C., C. Cocito, S. Ravaglia, and L. Conterno. Influence of clarification and suspended grape solid materials on sterol content of free run and pressed grape musts in the presence of growing yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:86-92 (1993).
21. Delfini, C., L. Conterno, D. Giacosa, C. Cocito, S. Ravaglia, and L. Bardi. Influence of clarification and suspended solid contact on the oxygen demand and long-chain fatty acid contents of free run, macerated and pressed grape musts in relation to acetic acid production. *Vitic. Enol. Sci.* 47:69-75 (1992).
22. Dombeck, K. M., and L. O. Ingram. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol in yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:975-981 (1986).
23. Drysdale, G. S., and G. H. Fleet. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 67:471-481 (1989).
24. Edwards, C. G. Stalking "ferocious" Lactobacilli. *Pract. Winery Vineyard* Sept/Oct:5-8 (1998).
25. Edwards, C. G., R. B. Beelman, C. E. Bartley, and A. L. McConnell. Production of decanoic and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:48-56 (1990).
26. Edwards, C. G., K. M. Haag, M. D. Collins, R. A. Hutson, and Y. C. Huang. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organisms associated with grape juice fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 84:698-702 (1998).
27. Gancedo, C., and R. Serrano. Energy-yielding metabolism. pp 205-259 *In The Yeasts ( 2nd Edition) Volume 3: Metabolism and Physiology of Yeasts*, A. H. Rose and J. S. Harrison (eds.). Academic Press, New York. (1989).
28. Gasch, A. P. The environmental stress response: A common yeast response to diverse environmental stresses. Pages 11-70 *In: S. Hohmann and P. W. H. Mager (eds) Topics in Current Genetics, Vol. 1: Yeast Stress Responses*, Springer-Verlag Berlin, (2003).
29. Heard, G. M., and G. H. Fleet. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bact.* 65:23-28 (1988).
30. Henschke, P. A., and V. Jiranek. Metabolism of nitrogen compounds. pp 77-164 *In Wine microbiology and biotechnology*, G. H. Fleet (ed.). Harwood Academic Publishers, Australia. (1993).
31. Houtman, A. C., and C. S. Du Plessis. Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 7:39-46 (1986).
32. Ingledew, W. M., and R. E. Kunkee. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:65-76 (1985).
33. Iwashima, A., H. Nishino, and Y. Nose. Carrier-mediated transport of thiamine in baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 330:222-234 (1973).
34. Jones, R. P. Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11:130-153 (1989).
35. Jones, R. P. Roles for replicative deactivation in yeast-ethanol fermentations. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10:205-222 (1990).
36. Jones, R. P., and P. F. Greenfield. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast* 3:223-232 (1987).

37. Kielhoefer, E. The effect of antibiotic substances upon the fermentation of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 5:113-17 (1954).
38. Kruckeberg, A. L. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166:283-292 (1996).
39. Kudo, M., P. Vagnoli, and L. F. Bisson. Imbalance of potassium and hydrogen ion concentrations as a cause of stuck enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:295-301 (1998).
40. Lafon-Lafourcade, S., C. Geneix, and P. Ribereau-Gayon. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1246-1249 (1984).
41. Lafon-Lafourcade, S., F. Larue, and P. Ribereau-Gayon. Evidence for the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of yeast growth especially in grape must of high sugar concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:1069-1073 (1979).
42. Lafon-Lafourcade, S., and P. Ribereau-Gayon. Developments in the microbiology of wine production. *Prog. Indust. Microbiol.* 19:1-45 (1984).
43. Lagunas, R., C. Dominguez, A. Busturia, and M. J. Saez. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of the sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152:19-25 (1982).
44. Linthorst, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:123-150 (1991).
45. Manginot, C., J. L. Roustan, and J. M. Sablayrolles. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microbial Tech.* 23:511-517 (1998).
46. Manginot, C., J. M. Sablayrolles, J. L. Roustan, and P. Barre. Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme Microbial Tech.* 20:373-380 (1997).
47. Mauricio, J. C., S. Guijo, and J. M. Ortega. Relationship between phospholipid and sterol content in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:301-308 (1991).
48. Mauricio, J. C., and J. M. Salmon. Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Biotech. Lett.* 14:577-601 (1992).
49. Medina, K., F. M. Carrau, O. Gioia, and N. Bracesco. Nitrogen availability of grape juice limits killer yeast growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with sensitive commercial yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2821-2825 (1997).
50. Monk, P. R. Effect of nitrogen and vitamin supplements on yeast growth and rate of fermentation of Rhine Riesling grape juice. *Food Tech. Aust.* 34:328-332 (1982).
51. Monteiro, F. F., and L. F. Bisson. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:47-57 (1991).
52. Nabais, R. C., I. Sa-Correia, C. A. Viegas, and J. M. Novais. Influence of calcium ion and ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* on alcoholic fermentation by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2439-2446 (1988).
53. Nelissen, B., R. DeWachter, and A. Goffeau. Classification of all putative permeases and other membrane multispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:133-134 (1997).

54. Ough, C. S., M. Davenport, and K. Joseph. Effect of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 40:208-213 (1989).
55. Pampulha, M. E., and C. Loureiro-Dias. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotech.* 31:547-550 (1989).
56. Ramon-Portugal, F., M. L. Delia, P. Strehaiano, and J. P. Riba. Mixed culture of killer and sensitive *Saccharomyces cerevisiae* strains in batch and continuous fermentations. *World J. Micro. Biotech.* 14:83-87 (1998).
57. Rasmussen, J. E., E. Schultz, R. E. Snyder, R. S. Jones, and C. R. Smith. Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:278-280 (1995).
58. Ravaglia, S., and C. Delfini. Production of medium chain fatty acids and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. *Ital. J. Food Sci.* 1:21-36 (1993).
59. Reifenberger, E., E. Boles, and M. Ciriacy. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245:324-333 (1997).
60. Ribereau-Gayon, P., S. Lafon-Lafourcade, D. Dubourdieu, V. Lucmaret, and F. Larue. Metabolism de *Saccharomyces cerevisiae* dans les mouts de raisin parasites par *Botrytis cinerea*. Inhibition de la fermentation; formation d'acide acetique et de glycerol. *CR Acad. Sci.* 289:441-444 (1979).
61. Sablayrolles, J.-M. Importance de l'azote assimilable de l'oxygene sur le deroulement de la fermentation alcoolique. *Biologia Oggi* 6:155-160 (1992).
62. Sablayrolles, J.-M., C. Dubois, C. Manginot, J.-L. Roustan, and P. Barre. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck fermentations. *J. Ferm. Bioeng.* 82:377-381 (1996).
63. Sagliocco, F., J.-C. Guillemot, C. Monribot, J. Capdevielle, M. Perrot, E. Ferran, P. Ferrara, and H. Boucherie. Identification of proteins of the yeast protein map using genetically manipulated strains and peptide mass-fingerprinting. *Yeast* 12:1519-1533 (1996).
64. Salmon, J. M. Effect of sugar transportation inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:9535-9538 (1989).
65. Salmon, J. M., and P. Barre. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3831-3837 (1998).
66. Salmon, J. M., O. Vincent, J. C. Mauricio, M. Bely, and P. Barre. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:56-64 (1993).
67. Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470 (1995).
68. Schulze, U., G. Liden, J. Nielsen, and J. Villadsen. Physiological effects of nitrogen starvation in an anaerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 142:2299-2310 (1996).
69. Schütz, M., and J. Gafner. Sluggish alcoholic fermentation in relation to alterations of the glucose - fructose ratio. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15:73-78 (1993).
70. Schütz, M., and J. Gafner. Lower fructose uptake capacity of genetically characterized strains of *Saccharomyces bayanus* compared to *Saccharomyces cerevisiae*: A likely cause of reduced alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:175-180 (1995).
71. Sharf, R., and P. Margalith. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotech.* 17:311-313 (1983).

72. Smith, D. A., and S. W. Banks. Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. *Phytochem.* 25:979-995 (1986).
73. Stanley, G. A., N. G. Douglas, E. J. Every, T. Tzanatos, and N. B. Pamment. Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotech. Letts.* 15:1199-1204 (1993).
74. Stanley, G. A., T. J. Hobley, and N. B. Pamment. Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. *Biotechnol. Bioeng.* 53:71-78 (1997).
75. Suutari, M., K. Liukkonen, and S. Laakso. Temperature adaptation in yeast: The role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136:1469-1474 (1990).
76. Takemoto, J. Y., L. Zhang, N. Taguchi, T. Tachikawa, and T. Miyakawa. Mechanisms of action of the phytotoxin syringomycin: A resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an involvement of Ca<sup>2+</sup> transport. *J. Gen. Microbiol.* 137:653-659 (1991).
77. Thomas, D. S., J. A. Hossack, and A. H. Rose. Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117:239-245 (1978).
78. Thomas, D. S., and A. H. Rose. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition. *Arch. Microbiol.* 122:19-25 (1979).
79. Thomas, K. C., S. H. Hynes, and W. M. Ingledew. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1519-1524 (1994).
80. Traverso-Rueda, S., and R. E. Kunkee. The role of sterols on growth and fermentation of wine yeast under vinification conditions. *Dev. Indust. Environ. Microbiol.* 23:131-143 (1982).
81. Viegas, C. A., M. F. Rosa, I. Sa-Correia, and J. M. Novais. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:21-28 (1989).
82. Viegas, C. A., and I. Sa-Correia. Toxicity of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* at temperatures between 8.5 and 30°C. *Enzyme. Microbiol. Tech.* 17:826-831 (1995).
83. Watson, K. Temperature relations. pp. 41-72 *In The Yeasts, Volume 2: Yeasts and the Environment*, A. H. Rose (Ed.). pp 41-71 Academic Press, New York (1987).
84. Young, T. W. Killer yeasts. pp 131-164 *In The Yeasts, Volume 2: Yeasts and the Environment*, A. H. Rose (Ed.). pp 131-164. Academic Press, New York (1987).