

ROLE PROTECTEUR DES STEROLS PENDANT LA PHASE DE REHYDRATATION DES LEVURES SECHES ACTIVES

Anne ORTIZ-JULIEN¹ & Jean-michel SALMON²

1. Lallemand SA. 19, rue des Briquetiers, Blagnac Cedex, 31702 France

2. Unité Mixte de Recherches «Sciences pour l'Oenologie», INRA, 2, place Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France.

jmsalmon@ensam.inra.fr

Résumé

Les Levures Sèches Actives utilisées pour l'ensemencement raisonné des fermentations en œnologie sont toutes commercialisées sous forme déshydratée. Une phase de réhydratation est donc nécessaire pour réactiver ces levures avant inoculation. Cette phase de réhydratation est notamment nécessaire pour l'obtention d'une bonne intégrité de la membrane plasmique, condition nécessaire pour une bonne survie ultérieure de la levure dans le milieu de fermentation. A ce stade de réhydratation, l'apport de stérols spécifiques sous forme soluble permet d'améliorer la structure de la membrane plasmique, et permet à terme à la levure de mieux assurer la fermentation alcoolique, tout particulièrement lorsque les conditions du milieu sont difficiles. En ce sens, les stérols jouent un rôle protecteur important des levures pendant la phase de réhydratation.

Modifications de la membrane plasmique pendant les phases de déshydratation et de réhydratation des levures

Le séchage des levures par déshydratation entraîne de profondes modifications de la structure interne des cellules, dues à la contraction du volume total de la cellule (1). Cette contraction du volume cellulaire conduit à un plissement important de la membrane plasmique et à l'apparition de ruptures dans la continuité de cette membrane (2, Figure 1).

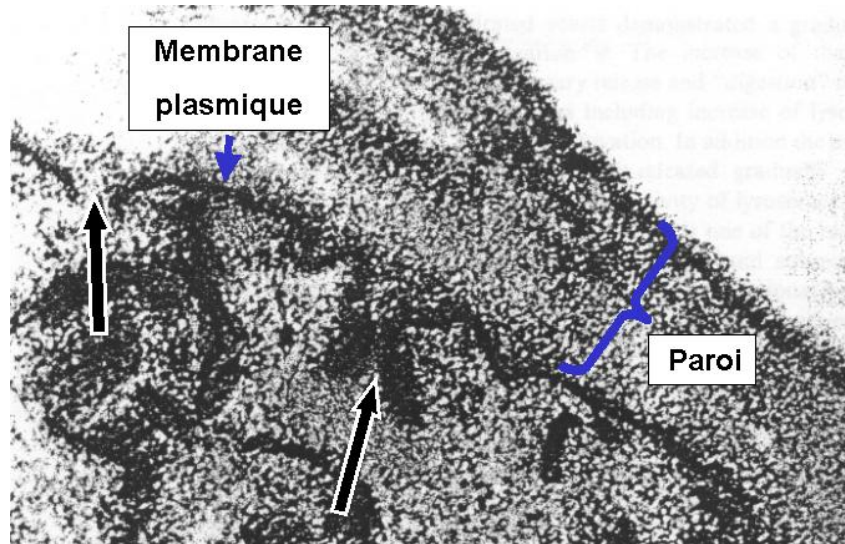


FIGURE 1 : Photographie en microscopie électronique (grossissement 145000) de cellules déshydratées de *Saccharomyces cerevisiae*. La membrane plasmique est fortement invaginée. Les flèches noires montrent les ruptures dans la membrane plasmique. D'après référence 1.

Lors de la phase de réhydratation des Levures Sèches Actives, les cellules commencent par mobiliser certaines réserves lipidiques stockées pour rapidement réparer ces membranes détériorées (3). Lors de cette étape de réhydratation, nous avons récemment démontré dans notre unité de recherches que les levures pouvaient également incorporer des lipides

extracellulaires pour réparer ces défauts de la membrane plasmique (4). Cette incorporation rapide (moins de 15 minutes) permet alors à la cellule de récupérer rapidement des membranes totalement fonctionnelles. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'incorporation des stérols, classe de composés connus pour exercer un rôle important dans la survie cellulaire lors des étapes finales de la fermentation alcoolique (5, 6). L'incorporation de stérols a été mesurée à l'aide d'un traceur radioactif ($[4-^{14}\text{C}]$ cholestérol) lors d'une réhydratation standard à 37°C , et en présence d'une suspension de stérols solubilisés (Figure 2).

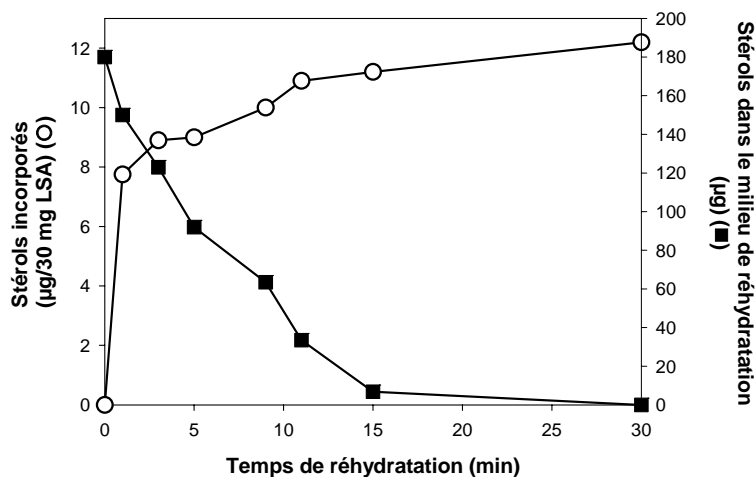


FIGURE 2 : Cinétique d'incorporation de stérols mesurée à l'aide de $[4-^{14}\text{C}]$ cholestérol pendant la réhydratation de la souche de référence (1 g) dans 10 ml d'eau glucosée (0,5 g) en présence d'une préparation de stérols solubilisés (25 mg) à 37°C .

Il apparaît donc nettement que les Levures Sèches Actives en cours de réhydratation peuvent incorporer de façon efficace et rapide des stérols fournis de façon extracellulaire, afin de participer à la réparation des membranes cellulaires affectées par la déshydratation (4).

Effet qualitatif de différents stérols sur la croissance et la viabilité des levures

Durant la fermentation alcoolique, les levures doivent impérativement incorporer des stérols exogènes afin de pouvoir se développer. Dans les moûts de raisin, des stérols sont présents sous forme de phytostérols, dont la nature chimique diffère des stérols normalement synthétisés par la levure en aérobiose (5). Ces phytostérols sont essentiellement localisés dans la peau de la baie de raisin et sont généralement extraits pendant les phases de macération (7). Une étude récente menée dans notre laboratoire a montré que de tels phytostérols à partir d'une concentration de 5 mg L^{-1} permettait de subvenir à la croissance des levures en conditions œnologiques (Figure 3), permettant donc d'avoir un début de fermentation correcte (5).

Toutefois, du fait de la différence de structure chimique entre les phytostérols et les stérols normalement trouvés dans les membranes levuriennes, la viabilité des levures chute de façon très précoce, lorsque les levures n'ont que des phytostérols comme source disponible de stérols (Figure 4).

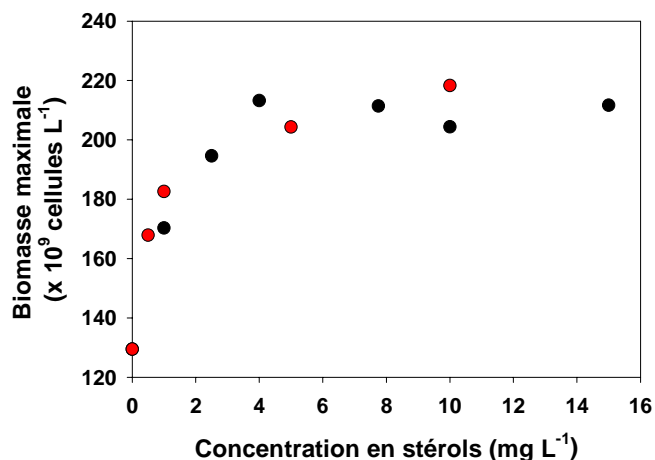


FIGURE 3 : Evolution de la population cellulaire maximale de levures lors de fermentation de la souche de référence cultivée en présence de divers teneurs en phytostérols du raisin (points rouges) ou de stérols d'origine levurienne (points noirs).

Les vitesses de fermentation correspondantes en phase stationnaire s'en trouvent donc considérablement affectées et peuvent dans des conditions défavorables entraîner des arrêts de fermentation (5).

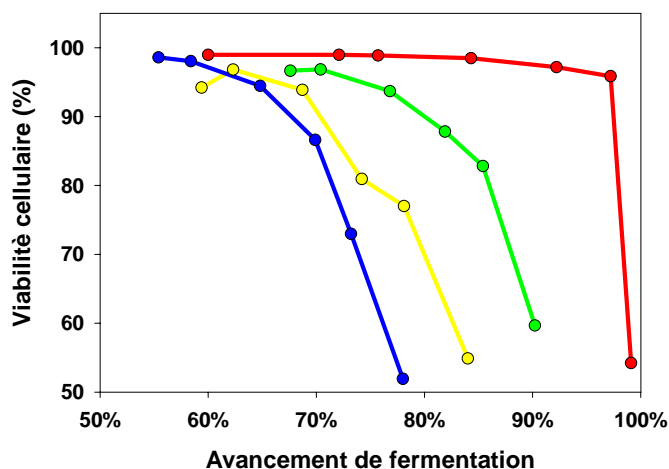


FIGURE 4 : Evolution de la viabilité cellulaire de levures lors de fermentation de la souche de référence cultivée en présence de phytostérols du raisin (1 mg L⁻¹, courbe bleue ; 5 mg L⁻¹, courbe jaune ; 10 mg L⁻¹, courbe verte) ou de stérols d'origine levurienne (10 mg L⁻¹, courbe rouge).

Or, de nombreux traitements préfermentaires, et notamment les opérations de clarification couramment pratiquées en vinification en blanc ou en rosé (comme le débouillage, 8) entraînent une floculation d'agrégats pectiques sur lesquels restent adsorbés les phytostérols. Les milieux sont alors dès le début de fermentation carencés en stérols assimilables par la levure de fermentation. Dans ces conditions, il est donc impératif de

favoriser, dès l'étape de réhydratation des Levures Sèches Actives, une conformation optimale des membranes cellulaires par l'incorporation de stérols spécifiques de levures.

Effet d'une incorporation de stérols solubilisés à partir de levures pendant la phase de réhydratation des levures sur leur performance fermentaire ultérieure

L'effet d'une addition de stérols levuriens solubilisés en cours de réhydratation de Levures Sèches Actives a donc été ensuite testé. L'effet obtenu sur les performances ultérieures des levures est remarquable. Dans des conditions de fermentation difficile (milieu contenant 8 mg L⁻¹ de phytostérols), les gains obtenus représentent de l'ordre de 20 à 25 heures de fermentation (Figure 5).

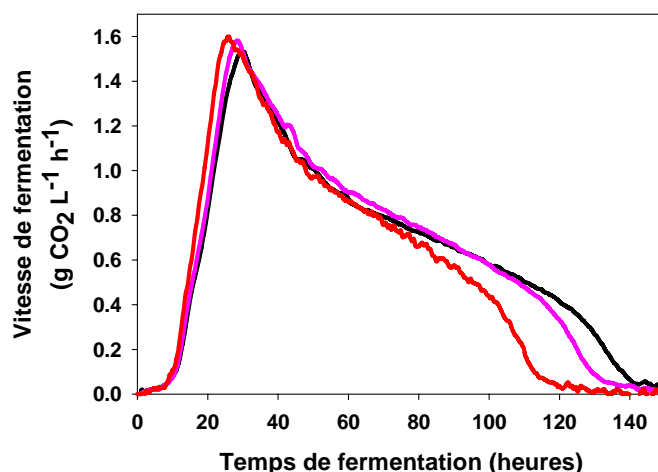


FIGURE 5 : Effet d'une addition de stérols levuriens solubilisés lors de la phase de réhydratation de la souche de référence. Réhydratation sans addition (courbe noire), en présence de stérols levuriens solubilisés (12 mg L⁻¹, courbe rose ; 24 mg L⁻¹, courbe rouge). Les cinétiques fermentaires sont suivies à 24°C sur un milieu de fermentation contenant 8 mg L⁻¹ de phytostérols.

L'effet positif sur la cinétique fermentaire d'une addition de stérols levuriens solubilisés lors de la phase de réhydratation est attribuable à une augmentation très significative de la viabilité cellulaire en phase stationnaire de fermentation alcoolique (Figure 6).

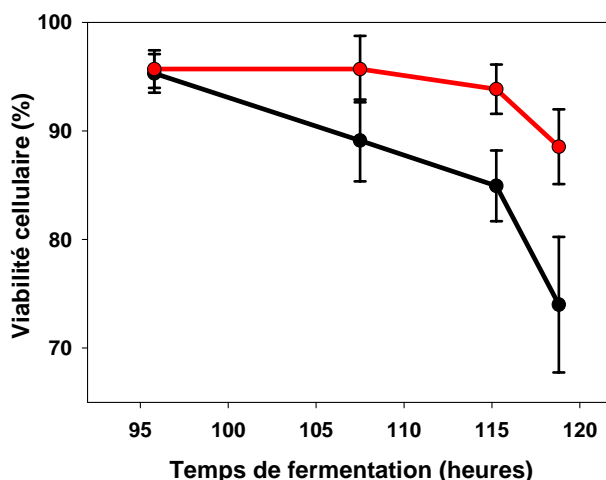


FIGURE 6 : Effet d'une addition de stérols levuriens solubilisés lors de la phase de réhydratation de la souche de référence. Réhydratation sans addition (courbe noire), en présence de stérols levuriens solubilisés (24 mg L⁻¹, courbe rouge). Les viabilités cellulaires sont suivies à 24°C lors de la fermentation d'un milieu de fermentation contenant 8 mg L⁻¹ de phytostérols).

Les écarts mesurés de viabilité cellulaire atteignent jusqu'à 20% entre les différentes conditions en fin de fermentation. Dans cette zone d'avancement de fermentation, la teneur en éthanol devient particulièrement toxique pour le métabolisme cellulaire. Dans ces conditions, les populations cellulaires présentant la plus haute viabilité cellulaire ont un avantage pour terminer correctement les fermentations.

Conclusions

La découverte récente de la capacité des Levures Sèches Actives à incorporer des stérols exogènes pendant la phase de réhydratation permet d'envisager une complémentation spécifique en stérols à ce stade technologique particulier. Toutefois, bien que les levures puissent assimiler de nombreux stérols d'origine variées, l'efficacité toute particulière des stérols d'origine levurienne est avérée. Dans ces conditions, l'apport de stérols spécifiques levuriens en cours de réhydratation sous forme soluble permet d'améliorer la structure de la membrane plasmique, et permet à terme à la levure de mieux assurer la fermentation alcoolique, tout particulièrement lorsque les conditions du milieu sont difficiles.

Bibliographie

1. Beker M.J., Rapoport A.I. Conservation of yeasts by rehydration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1987, 35, 127-171.
2. Rapoport A.I. Rejection of areas of damaged cytoplasm by microorganisms in a state of anabiosis. *Microbiology*, 1973, 42, 317-318.
3. Beker M.J., Blumbergs J.E.; Ventina E.J.; Rapoport A.I. Characteristics of cellular membranes at rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 19, 347-352.
4. Soubeyrand V., Luparia V., Williams P., Doco T., Vernhet A., Ortiz-Julien A., Salmon J.M. Improvement of the Fermenting Capacity of Active Dry Yeast (ADY) by Solubilized Sterols during Rehydration. *J. Agric. Food Chem.* 2005, sous presse.
5. Luparia V., Soubeyrand V., Berges T., Julien A., Salmon J.M. Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 65, 25-32.
6. Fornairon-Bonnefond C., Desmaretz V., Rosenfeld E., Salmon J.M. Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, 93, 176-182.
7. Valero E., Millan M.C., Mauricio J.C., Ortega J.M. Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1998, 49, 119-124.
8. Cocito C., Delfini, C. Experiments for developing selective clarification techniques: Sterol and fatty acid loss from grape must related to clarification technique. *J. Wine Res.*, 1997, 8, 187-197.