

PEUT-IL Y AVOIR DIFFERENCES DE DEGRE ALCOOLIQUE SELON LA SOUCHE DE LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE UTILISEE ? LA REPONSE EST NON

Antonio PALACIOS^{1,2}; Charlotte AUGUSTIN³; Fabiola SOTO⁴; Françoise RAGINEL⁵, Anne ORTIZ-JULIEN⁵

¹ Lallemand, 26360 Fuenmayor, La Rioja.; ² Universidad de la Rioja. Logroño, La Rioja.; ³ Sarco. Bordeaux, France; ⁴ Laffort, Rentería, Pais Vasco. ⁵ Lallemand I&D, Toulouse, France

Introduction

Quand il s'agit de produire des vins de qualité, il est très important de tenir compte du stade de maturité du raisin. Cet élément dépend des conditions climatiques de chaque millésime, puisque ces dernières peuvent conduire parfois à des déséquilibres entre la maturité technique (sucre, acidité et pH), la maturité aromatique (accumulation des précurseurs aromatiques variétaux) et la maturité phénolique (degré de polymérisation des composés phénoliques, tels que les tanins). Ces indices de maturation, qui dépendent donc du climat, peuvent progresser de façon équilibrée et simultanée, ce qui conditionnerait une maturation optimale de la baie. Toutefois, en cas d'étés excessivement chauds, le décalage entre la maturité des sucres et la maturité phénolique peut être énorme, et conduire à l'accumulation de grandes quantités de sucre dans les baies, baies présentant alors une faible acidité et des tanins encore verts.

Produire des vins bien mûrs avec des tanins agréables et doux est la tendance qui domine actuellement ; la maturité phénolique étant presque toujours en retard par rapport à la maturité technique, cela oblige à vendanger les raisins lorsque la maturité des sucres est très avancée. Ceci implique qu'une grande partie du volume total de raisin est en surmaturité technologique, voire même dans certains cas passerillée, ce qui se traduit ensuite par le développement d'arômes de fruits cuits ou d'arômes trop doux et écoeurants. Au contraire, si c'est avant tout la maturité technologique qui est visée, l'on peut devoir faire face à des cas de vendanges encore vertes dans leur composition phénolique, mais présentant suffisamment de sucres et d'acidité, et à partir desquelles l'on produira un vin aux arômes herbacés et végétaux, avec des tanins acides et agressifs en raison d'un manque de maturité phénolique. En outre, les changements climatiques et les améliorations apportées aux pratiques viticoles modernes participent de la même tendance de production de vins avec des degrés alcooliques plus élevés. Cependant, la richesse en alcool des vins pose des problèmes sociaux et également de marketing. Les habitudes de consommation changent, en raison de l'évolution des styles de vie ; les consommateurs exigent des vins plaisir, ronds avec une texture souple.

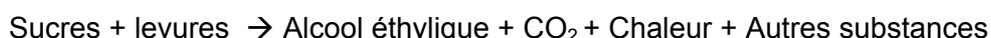
Il est donc nécessaire de disposer d'outils œnologiques qui permettent de vinifier des raisins présentant une bonne maturité phénolique, mais produisant des vins avec un titre alcoométrique moins élevé. Les levures sélectionnées de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* font-elles partie de ces outils œnologiques ?

Dans l'article qui suit, nous allons tenter de répondre à cette question.

Le métabolisme de la fermentation alcoolique :

La fermentation alcoolique est le processus au cours duquel les sucres contenus dans le moût sont convertis en alcool éthylique. Pour mener à bien ce processus, la présence de levures est nécessaire. Actuellement, l'utilisation de levures commerciales sous la forme de Levure Sèche Active (LSA) est une pratique commune et les LSA sont de plus en plus utilisées par les caves, pour l'élaboration de vins de qualité.

Le processus simplifié de la fermentation alcoolique est le suivant :



Les rendements moléculaires de la réaction sont :



1 gramme de glucose y génère 0,51 grammes d'éthanol et 0,49 grammes de dioxyde de carbone. Outre l'éthanol et le dioxyde de carbone, d'autres substances sont formées au cours de la fermentation alcoolique, à savoir : le glycérol, l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide pyruvique, l'acétaldéhyde, l'acide succinique, l'acétoïne, le diacétyl, le 2-3 butanediol (butylène glycol), des alcools supérieurs, des esters, des acétates, des vinyl-phénols et des éthyl-phénols principalement.

Produits du métabolisme des sucres par la levure :

Les principaux produits et sous-produits générés lors de la transformation du sucre du moût ainsi que d'autres composés au moment de leur métabolisation par les levures fermentaires sont présentés sous forme succincte ci-dessous :

- **Ethanol** : l'éthanol est le produit principal de la fermentation alcoolique. Il est communément admis qu'un degré d'éthanol (1% vol.) en fermentation alcoolique représente une consommation comprise entre 16,5 et 17 grammes par litre de sucres réducteurs (glucose ou fructose), en fonction des conditions de vinification.
- **Dioxyde de carbone** : il s'agit du second principal produit de la fermentation alcoolique. Selon les souches utilisées en conditions œnologiques, l'on peut considérer un rendement moyen de 0,4 à 0,5 grammes de CO₂ par gramme de sucres fermentés.
- **Glycérol** : les concentrations finales de glycérol en conditions œnologiques varient de 5 à 11 g/L selon la souche de levure. La production de glycérol sert à *Saccharomyces cerevisiae* pour faire face aux fortes pressions osmotiques, sortant au fur et à mesure de son accumulation de la cellule pour diffusion passive à travers la membrane.
- **Acides organiques** : à partir de la fermentation alcoolique se forment des acides organiques qui peuvent être libérés dans le milieu. Dans leur grande majorité, ces acides organiques sont dérivés du fonctionnement limité du cycle des acides tricarboxyliques. L'acide succinique est, comme le glycérol, l'un des sous-produits majoritaires de la fermentation alcoolique.
- **Alcools supérieurs et acides cétoniques** : la majorité de ces composés provient des acides aminés assimilés lors de la fermentation alcoolique. Le groupe aminé est éliminé par transamination et l'acide cétonique est ensuite décarboxylisé pour être converti en un aldéhyde, ce qui conduit à la formation d'un alcool supérieur qui possède un carbone de moins que l'acide aminé d'origine.
- **Esters** : ils sont produits par réactions enzymatiques où entrent en jeu les dérivés acyles gras et des alcools libres.
- **Acétoïne, 2,3-butanediol et diacétyl** : l'acétoïne est un composé qui trouve son origine au cours de la fermentation alcoolique et qui se forme en conditions très réductives, se transformant finalement en butanediol.
- **Croissance et biomasse** : au cours de la phase de croissance exponentielle, les levures se multiplient pendant 6 à 7 générations, ce qui génère une population maximale de 120-130x10⁶ cellules par millilitre. Cette biomasse représente à elle seule 3 grammes de poids sec par litre.

Données bibliographiques disponibles :

En ce qui concerne la bibliographie existante sur le sujet, nous pouvons citer le travail de Rankine, publié en 1953 dans la revue Australian Journal of Applied Science, « quantitative differences in products of fermentation », où il est démontré que des différences de rendement en alcool peuvent exister selon la souche utilisée. Néanmoins, ces différences-là semblent être nettement moins importantes que l'influence d'effets externes dépendant des conditions de fermentation appliquées en cave sur le rendement en alcool. La température, par exemple, peut faire varier jusqu'à 70% le rendement d'une souche, ainsi que la concentration en sucre initiale, bien que dans une moindre mesure. Tout comme la production d'acidité volatile dépend également de la température, la production de glycérol, elle, dépend de la concentration en sucre.

En 1982, Radler et Schütz ont réalisé une étude sur la production de glycérol par diverses souches du genre *Saccharomyces*. Cette étude a été publiée dans la revue *American Journal of Enology and Viticulture*. On y constate l'existence d'une corrélation entre le glycérol produit et la concentration en sucre, mais une fois de plus, ce phénomène semble bien moins lié à la souche de levure qu'aux conditions externes de vinification appliquées en cave.

Bertolini et al, en 1996, ont publié un travail sur la production d'alcool par des souches de levures cryotolérantes du genre *Saccharomyces*, qui confirme le fait que les souches cryotolérantes du genre *Saccharomyces (ex-uvarum)*, actuellement véritables *Bayanus*, produisent moins d'alcool. Néanmoins ce travail n'apporte que peu de résultats sur des différences quantifiées en éthanol. En outre, il faut souligner que ces souches ayant une faible aptitude fermentaire ont été retirées du marché.

Millan et Ortega ont publié en 1988 un travail qui fait référence à la production d'éthanol par des souches non-*Saccharomyces (Torulaspora delbuckii)*, présentant un rendement sucre/éthanol apparemment inférieur aux levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. À partir de ce travail, il a été conclu qu'il est possible de diminuer globalement le rendement en éthanol en travaillant avec cette espèce en phase pré-fermentaire, bien que cela puisse provoquer certains problèmes en terme de développement de populations de levures fermentaires, de nutrition, de colonisation et de possibles déviations organoleptiques.

Souza Oliveira *et al.* ont publié en 2004 une étude sur les critères de sélection de levures pour produire de la cachaza dans la revue *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, au cours de laquelle ils ont testé 24 souches de *Saccharomyces cerevisiae* en comparaison avec d'autres espèces (*Candida apicola*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *Hanseniospora occidentalis*, *Pichia subpelliculosa* et *Schizosaccharomyces pombe*). La production d'éthanol par les levures fut l'un des critères importants de sélection pris en compte. La grande majorité des levures appartenant à *S. cerevisiae* ont montré des rendements en alcool très similaires (un rendement proche de 91,7%), alors que les genres *Candida*, *Hanseniospora* et *Schizosaccharomyces* ont montré une capacité beaucoup plus faible de rendement en éthanol, produisant des contenus plus élevés de glycérol et d'acides organiques.

L'expérimentation :

L'objectif principal de cette étude est de savoir s'il existe des différences possibles dans l'obtention d'alcool lors de la fermentation de moûtsensemencés avec des levures commerciales sélectionnées disponibles sur le marché.

Afin de vérifier les rendements en alcool des levures commerciales sélectionnées, de microvinifications d'un volume de 1,1L ont été réalisées, avec deux conditions de fermentation différentes (simulation de vinification en blanc et en rouge). Pour effectuer ce travail, des levures provenant des 6 producteurs de levures sèches actives (LSA) principaux au niveau mondial ont été utilisées. 65 souches différentes de levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été comparées en simulation de vinification en rouge et 61 en simulation de vinification en blanc, avec un total de 113 souches différentes.

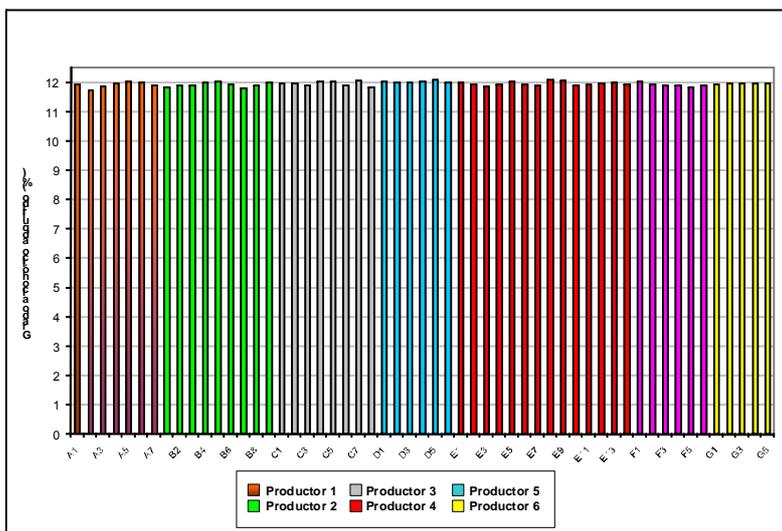
Pour mener ces simulations de vinification en rouge et en blanc, les levures ont été utilisées en suivant les recommandations des producteurs, c'est-à-dire en appliquant les conditions de vinification en blanc et en rouge selon les critères utilisés dans la sélection des souches et les critères d'application mentionnés sur les fiches techniques. 12 souches ont été utilisées aussi bien en blanc qu'en rouge, puisque les recommandations d'utilisation pouvaient s'appliquer aux deux types de vinification. C'est pour cette raison qu'un total de 115 souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement différentes les unes des autres a été étudié, ce qui représente plus de 95% des levures sélectionnées utilisées dans l'industrie œnologique.

Les conditions expérimentales ont été mises en place dans les laboratoires de R&D et de contrôle qualité de Lallemand, à Toulouse, en suivant deux types de protocole :

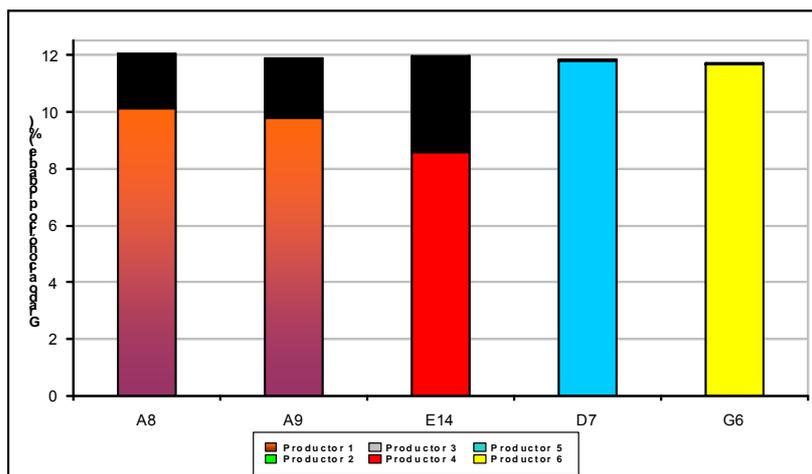
- Simulation de vinification en blanc : milieu synthétique MS300 (Bely *et al.*, 1991) avec 200 g/L de sucres initiaux et un degré alcoolique potentiel de 12° v/v, sans facteurs de croissance anaérobiques pour simuler les conditions de moûts très clarifiés et sans carence en azote assimilable (400 mg/L de NFA). Température de fermentation de 15°C.
- Simulation de vinification en rouge : milieu synthétique MS300 avec 280 g/L de sucres initiaux et un degré alcoolique potentiel supérieur à 16°C v/v, sans carence en azote assimilable (400 mg/L NFA). Température de fermentation de 28°C.

Le degré alcoolique des vins obtenus a été mesuré par infra-rouge (IR-INFRA 260, Bram/Luebbe), et les contenus finaux en sucre résiduel (glucose et fructose) par méthodologie enzymatique.

Les résultats du titre alcoométrique obtenus lors des expériences de vinification en blanc (graphiques 1 et 2) montrent que 56 souches ont été capables de fermenter tous les sucres, laissant les vins totalement secs. Pour ces 56 cas-là, la différence finale relevée entre le degré alcoolique le plus élevé (12,09° v/v) et le plus faible (11,75° v/v) a été de 0,34° v/v. En ce qui concerne les résultats de vinification en rouge (graphiques 3 et 4), en raison de la concentration en sucres initiale élevée, certaines souches de levure n'ont pas été capables de mener la fermentation à terme. La valeur minimale du titre alcoométrique est de 16,55° v/v et la maximale 17,06° v/v, avec une différence entre les deux de 0,51° v/v.



Graph. 1: résultats du titre alcoométrique (% v/v) de 56 souches de levure sélectionnées *Saccharomyces cerevisiae* en vinification en blanc qui ont été capables de fermenter tous les sucres.



Graph. 2: résultats du titre alcoométrique ((% v/v) de 5 souches de levure sélectionnées *Saccharomyces cerevisiae* en vinification en blanc qui n'ont pas été capables de fermenter tous les sucres (en noir sont représentés les degrés potentiels en alcool en fonction de la quantité de sucre non fermentée).

Les différences de titre alcoométrique peuvent être dues davantage à une marge d'erreur de la méthode analytique utilisée pour mesurer l'éthanol et les sucres, plutôt qu'aux différences possibles de rendement alcoolique des diverses souches utilisées, qui représentent la quasi-totalité des souches existantes sur le marché des levures sélectionnées au niveau mondial. De fait, dans la méthode analytique utilisée, l'erreur maximale adjacente à la méthode est de $\pm 0,2^\circ$ v/v, c'est-à-dire qu'il existe une marge de $0,4^\circ$ v/v, qui reflète quasiment les différences observées dans les titres alcoométriques finaux des vins secs et, dans les cas de fermentations inachevées, dans l'alcool potentiel final si l'on tient compte des sucres fermentés et non fermentés.

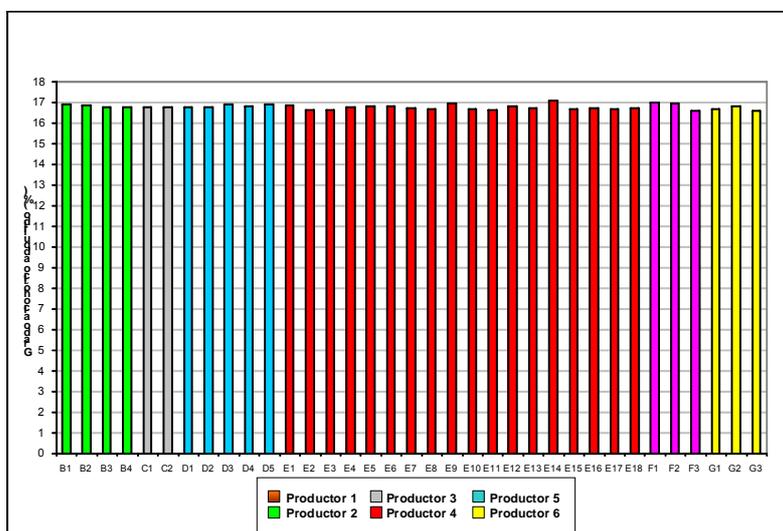


Figure 3 : résultats du titre alcoométrique ((% v/v) de 35 souches de levure sélectionnées *Saccharomyces cerevisiae* en vinification en rouge qui ont été capables de fermenter tous les sucres .

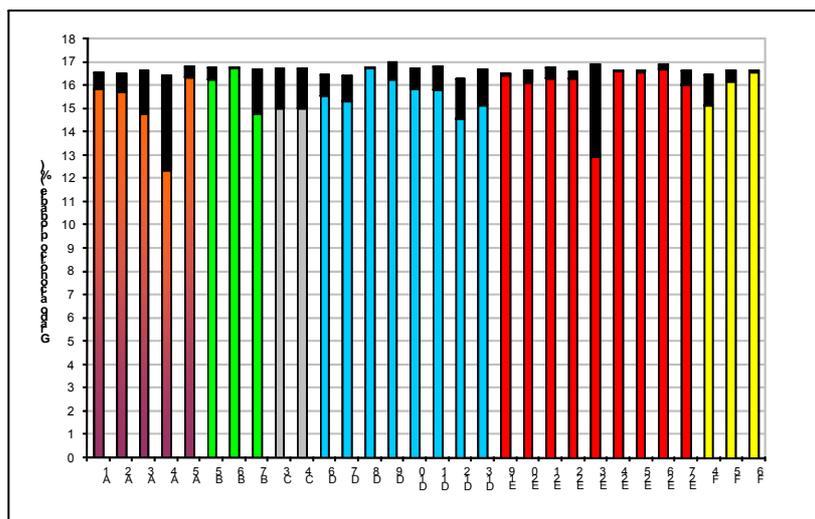


Figure 4 : résultats du titre alcoométrique (% v/v) de 30 souches de levure sélectionnées *Saccharomyces cerevisiae* en vinification en rouge qui n'ont pas été capables de fermenter tous les sucres (en noir sont représentés les degrés potentiels en alcool en fonction de la quantité de sucre non fermentée).

Discussion sur les résultats, conclusions et autres voies biologiques d'intérêt :

Dans l'étude présente, la caractérisation du rendement alcoolique de la quasi-totalité des levures *Saccharomyces cerevisiae* commerciales, fournies par les principaux producteurs de levures sélectionnées sous forme de LSA au niveau mondial a été effectuée. La partie expérimentale de l'étude a permis de conclure que cette espèce ne peut par elle-même pas produire des titres alcoométriques significativement inférieurs au degré potentiel moyen défini par la concentration en sucres initiale. Elle ne le peut pas non plus à partir de concentrations en sucres initiales élevées, comme l'illustrent parfaitement les conditions de vinification en rouge du présent travail.

Étant donné que l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* n'offre donc pas des différences significatives pour l'obtention de degrés alcooliques faibles par voie biologique, il est donc nécessaire d'explorer d'autres voies biologiques à cette fin. Malheureusement, pour le moment ces voies biologiques alternatives ne sont pas disponibles sur le marché ; elles sont néanmoins à l'étude, avec des avancées prometteuses applicables dans un futur proche. Les voies biologiques suivantes peuvent, entre autres, être les plus importantes :

- Utilisation de levures non *Saccharomyces* à faible rendement alcoolique
- Obtention de levures à faible rendement alcoolique par hybridation
- Obtention de levures à faible rendement alcoolique par génie génétique (OGM)
- Obtention de levures à faible rendement alcoolique par utilisation d'inhibiteurs métaboliques.

Bibliographie :

- Becker y Betz; (1972): Membrane transport as controlling pace-maker of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys Acta, N° 274, 584-597.
- Bely M.; Sablayrolles J.M. y Barre P.; (1991). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. J. Ferm. Bioeng. N° 70, 246-252.
- Bertolini L.; Zambonelli L.; Giudici P. y Castellari L.; (1996). Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. American Journal of Enology and Viticulture. Vol 47, N° 3, 343-345.
- Chuang L.F. y Collins E.B.; (1968). Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeasts. J. Bacteriol. N° 95, 2083-2089.
- Geiger E. y Piendl A.; (1975). Technological factors in the formation of acetolactate and acetohydroxybutyrate during fermentation. Brew Dig. N° 67, 50-63.
- Millan C. y Ortega J.M.; (1988). Production of ethanol, acetaldehyde, and acetic acid in wine by various yeast races: role of alcohol and aldehyde dehydrogenase. American Journal of Enology and Viticulture, Vol 39, N° 2, 107-112.
- Pena A., Cinco G., Gomez-Puyon A. y Tuena M.; (1972). Effect of pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem: Biophys. N° 153, 413-425:
- Radler F. y Schütz H.; (1982). Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. American Journal of Enology and Viticulture. Vol 33, N° 1, 36-40.
- Rankine B.C.; (1953). Quantitative differences in products of fermentation. Australian Journal of Applied Science. N° 4, 590-602.
- Ribéreau-Gayon J. y Peynaud E.; (1956). Investigations on the origin of secondary products of alcoholic fermentation. American American Journal of Enology and Viticulture. N° 7, 53-61.
- Rieger M. y Kapelli O.A.; (1983). The role of limited respiration in the incomplete oxydation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., N° 129, 53-61.
- Souza Oliveira, E.; Rosa, C.A.; Morgano, M.A. y Serra, E.; (2004). Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. World Journal of Microbiology & Biotechnoly, N° 20, 19-24.