

LES LEVURES IMMOBILISEES : UTILISATIONS OENOLOGIQUES ACTUELLES

Felipe RAMON PORTUGAL¹, Sofia SILVA¹, Patricia Taillandier² et Pierre STREHAIANO².

¹ Proenol, Travessa das Lages, 267, Apartado 547 4405-194 Canelas, V.N.Gaia, Portugal

² LGC.UMR CNRS 5503, INP-ENSIACET 118 Route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4. France

INTRODUCTION

L'observation des réactions biologiques (c'est à dire réalisées par un micro-organisme) met en évidence que ces réactions peuvent avoir lieu dans deux systèmes différents :

- un système dans lequel les micro-organismes sont en suspension dans la phase liquide (qui semble homogène) : c'est le cas des fermentations en œnologie, ou en brasserie.
- un système dans lequel les micro-organismes ne sont pas libres mais apparaissent fixés à un support, créant ainsi un système à deux phases distinctes : le procédé d'épuration par lit bactérien peut être un exemple.

En œnologie, discipline traditionnelle, le concept de micro-organisme libre domine largement. Par contre dans d'autres domaines, on a, dès les années 60, cherché à fixer les « catalyseurs » de la réaction et les applications industrielles ont rapidement suivi : bactéries adsorbées en vinaigrerie, disques bactériens en épuration.....

Avant de développer quelques applications œnologiques des micro-organismes immobilisés, nous allons rappeler quel est l'intérêt d'un tel protocole et définir les différentes possibilités techniques existantes.

Pourquoi immobiliser les micro-organismes ?

L'immobilisation (ou le confinement) des micro-organismes présente plusieurs avantages :

- le micro-organisme peut être réutilisé après un cycle de fonctionnement (voir plus loin l'application à la désacidification des moûts).
- le micro-organisme n'étant pas dispersé dans le milieu sa récupération en fin de culture est facilitée (voir plus loin l'application à la prise de mousse).
- il est possible de mettre en œuvre une population microbienne très importante sans avoir à réaliser la phase de croissance ce qui permet d'accroître les vitesses réactionnelles (voir plus loin l'application au traitement des arrêts de fermentation).

Comment immobiliser les micro-organismes ?

L'immobilisation ou le confinement des micro-organismes peut être réalisé de différentes méthodes qui découlent pour la plupart de celles proposées initialement par Chibata (1979) pour les enzymes. Trois catégories peuvent être définies.

- l'inclusion : ici les cellules microbiennes sont incorporées dans la matrice d'un polymère rigide, le plus utilisé étant l'alginate de calcium (Margaritis et Merchant, 1984). C'est ce procédé (adapté à la réalisation de sphères en double couche et séchées) qui sera développé plus loin. Ce procédé présente l'avantage d'assurer une bonne rétention des micro-organismes dans le gel.

- l'adsorption : ici la fixation des micro-organismes au support est liée à la création de liaisons faibles entre la paroi microbienne et le support (bois, brique, pouzzolane...). Un des inconvénients majeurs de cette technique est le risque de désorption, par exemple lors de la mort des micro-organismes.

- la rétention des micro-organismes sans support. Cette terminologie regroupe :

- les systèmes résultant de l'agglomération spontanée (ou provoquée) des cellules microbiennes. La capacité à la floculation de certaines souches de levures est par exemple mise à profit pour la prise de mousse des vins effervescents.
- les procédés visant à confiner les micro-organismes dans une partie du réacteur grâce à une barrière physique, une membrane de micro-filtration en général. En œnologie, une réalisation intéressante était la cartouche « Millispark » développée par Millipore pour la maîtrise de la prise de mousse (Lemonnier et Duteurtre, 1989).

Dans ce travail, nous nous limiterons à la présentation des résultats ayant abouti à des réalisations significatives au niveau de la cave. Ils sont issus des travaux menés conjointement par le laboratoire (UMR CNRS 5503) et la société Proenol Lda (Porto) depuis

une dizaine d'années. Ces réalisations concernent la prise de mousse tant en méthode traditionnelle qu'en méthode dite ancestrale, la désacidification des moûts ou des vins par *Schizosaccharomyces pombe*, le traitement des arrêts de fermentation et le contrôle de la fermentation en liquoreux.

PRODUCTION DES LEVURES INCLUSES.

Quelle que soit la nature de la levure (*Saccharomyces* ou *Schizosaccharomyces*) le procédé de fabrication des billes de cellules incluses est le même.

L'immobilisation des levures en gel d'alginate double couche est réalisée suivant le protocole proposé par Tanaka et coll. (1989). La biomasse levurienne est ajoutée à une solution aqueuse d'alginate (4%). Le mélange est pompé vers le tube interne d'un dispositif constitué de deux tubes concentriques et, dans le même temps, une solution d'alginate stérile (4%) est conduite dans le tube externe. Le flux d'alginate est scindé de façon à former des gouttes qui tombent dans une solution de chlorure de calcium ce qui induit la gélification de l'alginate : ainsi les sphères obtenues sont constituées d'un noyau interne qui emprisonne les levures et d'une couche externe et continue d'alginate stérile qui s'oppose à la sortie des cellules levuriennes. Ces billes (communément appelées ainsi à cause de leur géométrie sphérique) sont ensuite partiellement déshydratées par séchage en lit fluidisé ensuite elles sont conditionnées sous atmosphère inerte et conservées à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation. Alors, les billes sont réhydratées suivant le protocole spécifié par le fabricant et différent suivant l'application réalisée.

Par rapport aux procédés antérieurs, souvent développés au niveau du laboratoire mais plus rarement au stade pilote industriel, celui-ci offre l'avantage de fournir des billes sèches donc stables dans le temps (comme les LSA) et faciles à manipuler et à doser (indispensable pour la prise de mousse).

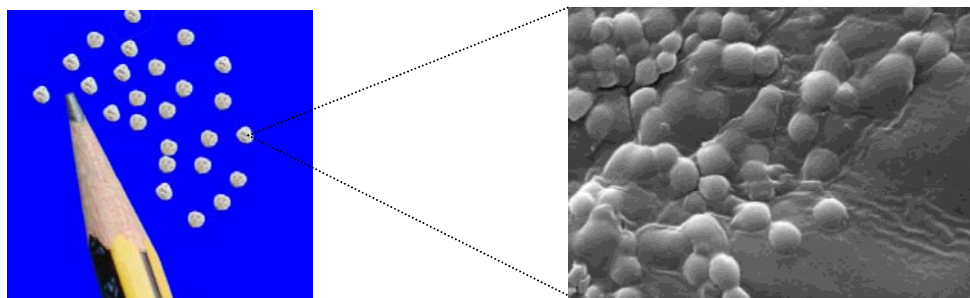


Figure 1. Les levures encapsulées sèches dans du gel d'alginate de sodium présentent une forme sphérique de 2 mm de diamètre (A). Photographie de l'intérieur d'une bille prise avec un microscope électronique (B)

APPLICATIONS OENOLOGIQUES

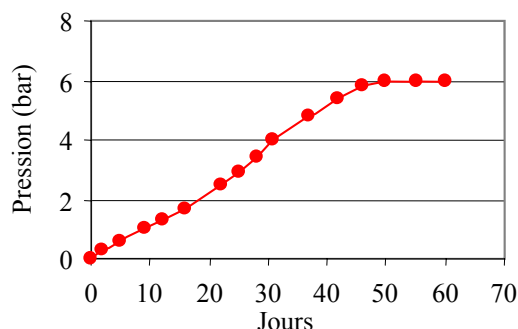
Prise de mousse

Dans ce cas, l'introduction d'une quantité de levures incluses directement dans la bouteille peut remplacer l'addition traditionnelle de levures libres pour la réalisation de la deuxième fermentation ou prise de mousse. Avant l'application de levures incluses, le vin de base doit être stable vis à vis des précipitations tartriques et stérile afin d'éviter le développement de levures ou bactéries que le remuage traditionnel pouvait permettre d'éliminer. Du fait que les levures incluses (*S. cerevisiae*, souches commerciales, Proelif®) sont retenues à l'intérieur du support solide, le processus de remuage est effectué en quelques secondes par le simple fait d'inverser la bouteille (figure 2.A). Ainsi le dépôt rapide des levures peut être obtenu après l'épuisement total des sucres (méthode traditionnelle) ou lorsque la concentration des sucres résiduels atteindra une valeur déterminée (méthode ancestrale) ; cette évolution est appréciée par la mesure de la pression (figure 2.B). Le dégorgement s'effectue ensuite de manière classique. Cette application est à l'heure actuelle celle qui est la plus significative au

plan de sa mise en œuvre industrielle puisque pour la seule société Proenol 8 millions de bouteilles ont été réalisées en 2002. Du fait que ces billes sont actuellement disponibles sous forme sèche, on peut attendre un large développement de ce procédé.



A



B

Figure 2. Le remuage est effectué en quelques secondes par le simple fait d'inverser la bouteille (A). Evolution de la pression dans la bouteille après tirage en utilisant de levures incluses en billes d'alginate de calcium sèches (B).

La désacidification de moûts

La levure *Schizosaccharomyces (Shz.) pombe* qui a la capacité de transformer l'acide malique en éthanol a été proposée comme une alternative à la fermentation malo-lactique (Ciani, 1995 ; Dharmadhikari et Wilker, 1998). Toutefois, certains auteurs soulignent le risque d'obtenir des vins aux caractéristiques organoleptiques inférieures à ceux issus des fermentations traditionnelles en cas de croissance excessive de cette levure (Bidan et coll., 1974). Afin de minimiser cet inconvénient la réalisation du processus de désacidification/vinification a été proposée en deux étapes : dans un premier temps, le moût de raisin estensemencé par *Shz. pombe* et lorsque la dégradation de l'acide malique a atteint le niveau souhaité la population de *Shz. pombe* est éliminée du moût par filtration ou par pasteurisation. Dans une deuxième étape, une souche commerciale de *S. cerevisiae* est apportée pour la réalisation de la fermentation alcoolique. Ces protocoles ont donné de bons résultats à l'échelle du laboratoire ou dans des micro-vinifications mais l'extrapolation aux conditions réelles de vinification est difficile. L'utilisation de levures de *Shz pombe* (souche G 2. ICV) encapsulées a donc été envisagée en raison de leur séparation facile après la démalication partielle ou totale du moût de raisin (Magyar et Panyik, 1989 ; Taillandier et Strehaiano, 1991 ; Yokotsuka et coll., 1993).

Les premiers travaux conduits au laboratoire ont mis en évidence que cette souche de *Shz. pombe* était capable d'utiliser l'acide malique, jusqu'à des concentrations élevées (20 g/L), et que cette consommation pouvait se faire en phase de croissance ou stationnaire avec ou sans une consommation simultanée de sucre (Figure 3A). Il est donc possible d'utiliser les capacités désacidifiantes de cette souche soit sur le moût avant la fermentation alcoolique (protocole le plus courant), soit sur le moût en fin de fermentation alcoolique, par exemple dans les cas où la fermentation malo-lactique ne se réalise pas.

L'activité démalicante de la levure *Shz. pombe* encapsulée (Promalic®) a été testée avec une concentration équivalente à 5 millions de cellules viable par millilitre de moût de raisin. La figure 3B montre trois cycles de démalication successives à l'échelle du laboratoire ; à la fin de chaque cycle les billes de *Shz pombe* ont été rincées et égouttées avant leur réutilisation pour le cycle suivant. Pendant le premier cycle, le profil de consommation d'acide malique en fonction du temps de contact montre que pour consommer 9 grammes / litre d'acide malique, 75 heures de fermentation seulement sont nécessaires à une température de 20 °C. A partir du deuxième cycle, pour consommer la même quantité d'acide malique le temps de contact diminue considérablement.

Des tests de conservation montrent que les levures encapsulées peuvent être conservées au moins 20 mois après leur immobilisation sans perdre de leur activité démalicante ; ce temps de conservation est comparable à celui des levures sèches actives.

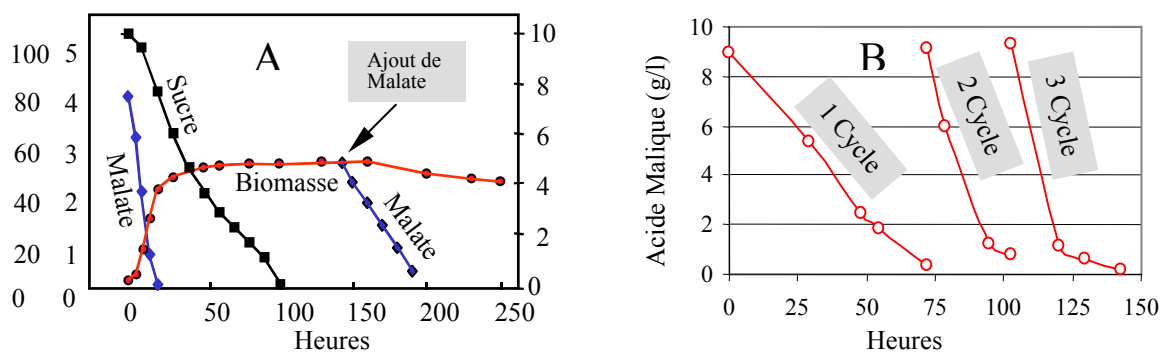


Figure 3. Profil de consommation d'acide malique en fonction de la phase de croissance et de la concentration de sucres résiduels (A). Evolution au cours du temps de la concentration d'acide malique résiduel pour trois cycles successifs de démalication en utilisant *Shz. pombe* incluse (B).

Des essais dans des conditions réelles de vinification ont été conduits sur des volumes de 300 à 1000 litres, sur des moûts blancs ou rouges, en France et au Portugal. Les billes contenant les levures sont initialement placées dans des sacs en Nylon qui permettent la libre diffusion du moût tout en s'opposant au passage des billes dans le milieu (voir figure 4A et 4B). Ces sacs sont introduits (après réactivation des billes) dans la cuve de fermentation, et la consommation d'acide malique est appréciée par exemple par le suivi de l'acidité totale ou du pH. Lorsque l'indicateur choisi atteint la valeur voulue, les sacs sont retirés du milieu et un levurage est effectué selon le protocole habituel. Dans ces essais, seule une réduction partielle était souhaitée. La figure 5A montre un des résultats obtenus en matière de diminution de l'acidité totale au cours du traitement en comparaison avec une vinification témoin.

La présence de défauts aromatiques a parfois été évoquée lors de l'utilisation de *Schizosaccharomyces* (Bidan et coll., 1974). Dans ce travail, 9 composés volatils ont été dosés dans les vins blancs issus des moûts désacidifiés et dans les vins témoins. Nous n'avons trouvé aucune différence significative entre l'essai et le témoin. Par ailleurs, un test de dégustation a été effectué sur les vins traités et leurs témoins respectifs. Un essai triangulaire a d'abord été effectué, puis les vins ont été soumis à une dégustation en imposant 12 descripteurs organoleptiques. Les résultats de l'essai triangulaire ont montré une différence significative entre les vins traités avec *Shz. pombe* et les vins témoins (non désacidifiés). Les résultats de la seconde étape ont montré un meilleur équilibre organoleptique des vins traités par rapport aux témoins. Dans l'ensemble, les vins désacidifiés ont été perçus comme plus équilibrés, avec plus de persistance et une structure améliorée. En ce qui concerne l'appréciation olfactive, les vins traités ont été mieux notés ; ces vins se caractérisent par les descripteurs « floral, citrique et tropical ». A titre d'exemple, la figure 5B montre les profils organoleptiques d'un vin blanc (traité par les billes) et de son contrôle : on voit clairement la réduction de la perception «acide» et le gain sur les descripteurs que nous venons de mentionner.



Figure 4. Les levures encapsulées sont placées dans les sacs de Nylon, la longueur des sacs a été adaptée à la hauteur de la cuve de fermentation. Un lest est fixé à l'extrémité inférieure des sacs, afin d'éviter qu'ils ne flottent. Les sacs sont suspendus à la partie supérieure de la cuve de fermentation (A). Avant introduction dans la cuve de fermentation, les sacs contenant les billes sont réhydratés pendant 30 minutes dans une solution sucrée avec 40 g/L de saccharose afin de réactiver les levures (B).

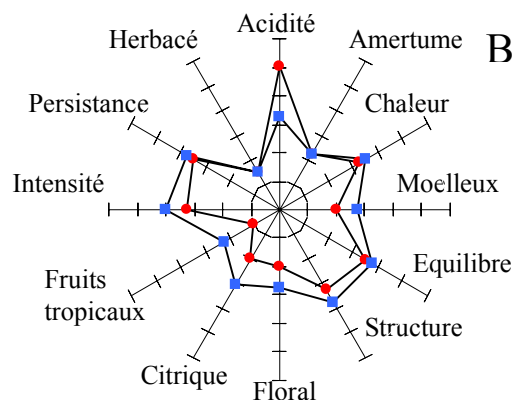
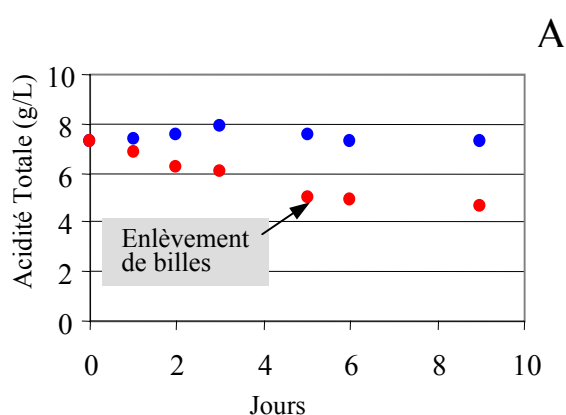


Figure 5. Evolution de l'acidité totale (H_2SO_4) au cours d'une vinification en blanc en utilisant de levures de *Shz. pombe* encapsulée et de *S. cerevisiae* libre ● en comparaison avec un témoin réalisé uniquement avec *S. cerevisiae* libre ● (A). Comparaison de deux profils organoleptiques d'un vin blanc issu d'un moût traité avec *Shz. pombe* incluse ■ et du vin témoin ● (B).

Traitement des arrêts de fermentation

Quelle que soit la cause de l'arrêt (Bisson, 1999 ; Alexandre et Charpentier, 1998 ; Ribereau-Gayon, 1999) dans certains cas, les protocoles curatifs ne sont pas efficaces. L'utilisation de micro-organismes inclus peut constituer une solution en raison du contrôle aisé de l'activité des micro-organismes qu'elle permet : maîtrise des quantités, maîtrise du temps d'action, possibilité de réutilisation.

Le protocole d'application (Silva et coll., 2002) consiste tout d'abord à réhydrater et activer la levure de *S. cerevisiae* encapsulée (Prorestart®). Ainsi, les sacs contenant les billes sont immergés pendant 3 heures dans une solution aqueuse dont la composition en g/L est la suivante : saccharose 80, Fermaid 0,4 (Lallemand S.A., Canada). Pour chaque kilogramme

de billes, 5 litres de solution de réhydratation/activation sont utilisés. Ensuite, une étape d'acclimatation consiste à immerger les billes dans une solution constituée de 70% de la solution précédente et de 30% du vin à traiter. La durée de cette phase est de 5 heures. Puis les sacs sont égouttés pour éliminer l'excédent de solution de réactivation et finalement les sacs sont introduits dans la cuve en arrêt de fermentation alcoolique.

La figure 6A montre l'évolution de sucres réducteurs après l'incorporation de cellules actives de *S. cerevisiae* 1118 encapsulées pour le traitement d'un arrêt de fermentation en rouge. Le volume de vin (cépage Cabernet Sauvignon) traité pour cet exemple a été de 325 hL. Tout au long du traitement, la cuve de fermentation a été maintenue à 20 °C. On peut observer que lorsque les sacs contenant les levures de *S. cerevisiae* ont été introduits dans la cuve, une activité fermentaire a été immédiatement constatée. Dans ce cas, la vitesse de consommation de sucres atteint une valeur maximale de 2,8 g/L de sucres consommés par jour de traitement. La vitesse de consommation des sucres diminue progressivement jusqu'à atteindre sa valeur minimale après 6 jours de traitement. La figure 6.B illustre le traitement d'un vin blanc en arrêt de fermentation à 14 g/L de sucres réducteurs.

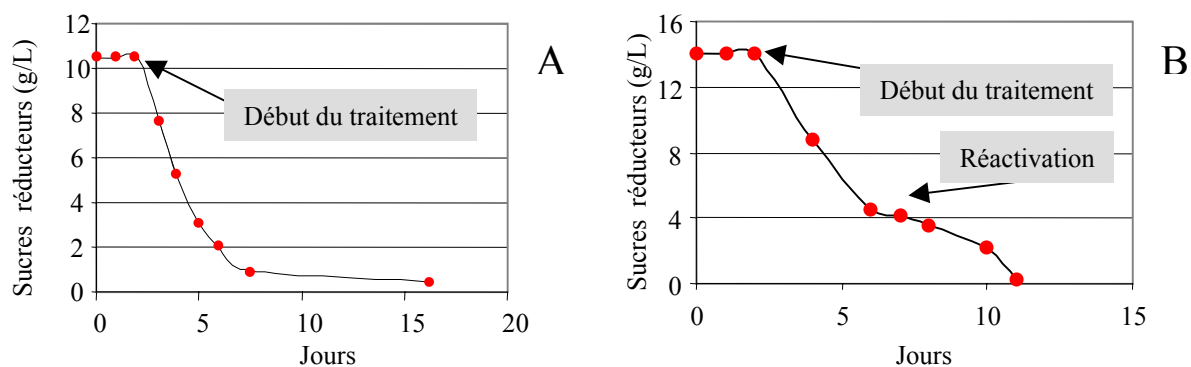


Figure 6. Evolution de la concentration des sucres résiduels après traitement d'un arrêt de fermentation en utilisant *S. cerevisiae* incluse dans des billes d'alginate de calcium en vinification en rouge dans un volume de 325 hL (A). Vinification en blanc dans un volume de 22 hL (B).

La vinification des vins moelleux

L'avantage de pouvoir retirer les cellules immobilisées à une concentration de sucres bien établie au préalable a été exploité dans ce travail pour la production de vin doux. En effet, dans la vinification des vins blancs à teneur résiduelle élevée en sucres, la fermentation alcoolique devra être rigoureusement arrêtée lorsque la concentration des sucres résiduels atteindra une valeur prédéfinie, fonction des caractéristiques souhaitées du produit final et de l'ordre de 50 à 100 grammes par litre. Couramment, l'arrêt de la fermentation alcoolique au moment voulu est obtenu par refroidissement et/ou soutirage à l'abri de l'air, filtration et enfin mutage au dioxyde de soufre (SO₂ L = 50-60 mg/L). Les levures incluses offrent la possibilité de retirer les micro-organismes et ainsi de stopper la fermentation au niveau voulu sans avoir recours à un inhibiteur.

Nous présentons ici, à titre d'illustration, les résultats obtenus en conditions réelles de vinification de vin moelleux en utilisant des levures de *S. cerevisiae* incluses pour assurer la fermentation alcoolique. Sur la figure 7 sont portées les courbes d'évolution des concentrations de l'éthanol et des sucres résiduels. La température pendant la fermentation a été mesurée mais non contrôlée, la valeur moyenne a été d'environ 16 °C. Au 20^e jour, un apport de moût frais dans la cuve de fermentation a provoqué une perturbation dans le profil cinétique, mais sans empêcher la poursuite de la fermentation jusqu'à une valeur de 49 grammes par litre de sucres résiduels (très proche des 50 grammes par litre souhaité par l'œnologue). A ce moment-là les sacs sont retirés de la cuve. La figure 7 montre que après l'enlèvement de billes, la concentration des sucres réducteurs n'a pas évolué, ce qui indique

qu'il n'y a eu aucune activité fermentaire par d'éventuelles levures indigènes ou par des bactéries : on n'a pas noté d'évolution ni de l'éthanol ni de l'acidité volatile (Silva et coll., 2002). Les valeurs de ces variables sont restées constantes pendant 15 jours après le retrait des levures immobilisées.

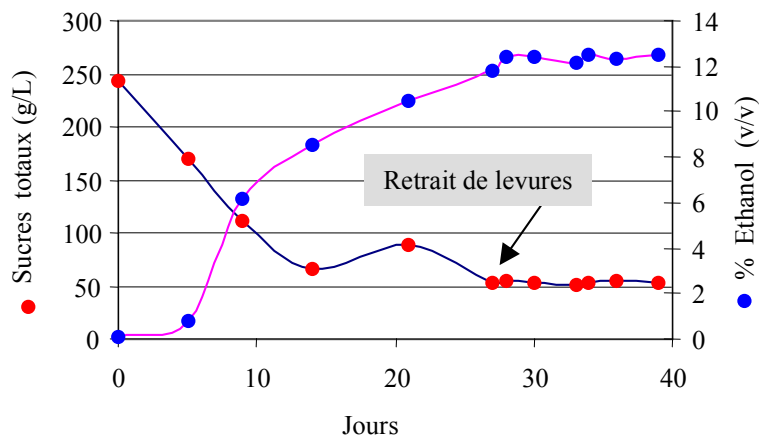


Figure 7. Evolution de la consommation des sucres réducteurs, de la production d'éthanol au cours de la vinification du blanc moëlleux par des levures immobilisées de *S. cerevisiae*.

CONCLUSION

Les études menées depuis plus de dix ans sur la formulation de levures incluses ont abouti à la mise au point de ces billes double-couche sèches. Ainsi le praticien dispose d'un outil technique performant, stable et simple d'emploi. Les principales applications de ces formulations concernent à ce jour la prise de mousse, la désacidification des moûts par les levures *Schizosaccharomyces* et le traitement curatif des arrêts de fermentation. Une autre utilisation intéressante concerne la maîtrise de la fermentation en liquoreux, cas dans lequel se pose toujours le problème de l'arrêt de fermentation au moment voulu.

Les recherches complémentaires conduites actuellement portent sur :

- l'application des levures *Schizosaccharomyces* incluses à la désacidification de moûts en fin de FA et dont la FML ne se réalise pas. Sur ce sujet des résultats préliminaires positifs ont été obtenus au stade laboratoire. Les validations en cave sont en cours.
- l'inclusion de levures spécifiques dont on peut souhaiter une activité partielle dans le moût, par exemple des levures aromatiques.
- l'inclusion de bactéries lactiques.
- l'inclusion d'enzymes spécifiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alexandre H. and Charpentier C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 20, 20-27.
2. Bidan P., Meyer J. P. and Schaeffer A., 1974. *Bull. OIV*, 47, 682-706.
3. Bisson L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 107-119.
4. Chibata I., 1979. Immobilized microbial cells. Application. In actes du Colloque SFM, 7-44. Compiègne, 8-9 mars 1979.
5. Ciani M. 1995. Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 631-634.
6. Désert S. and Hubert L., 2002. Le dioxyde de soufre est-il irremplaçable ? *Rev. Des Œnologues.* 102, 35-36.
7. Dharmadhikari M. R. and Wilker K. L., 1998. Deacidification of high malate must with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 408-412.
8. Lemonnier J. and Duteurtre B., 1989. Un progrès important pour le champagne et les vins de méthode traditionnelle. *Rev. Fr. Oenol.*, 121, 15-26.

9. Magyar I. and Panyik I., 1989. Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. Am. J. Enol. Vitic., 40, 233-240.
10. Margaritis A. and Merchant F.J.A., 1984. Advance in ethanol production using immobilized cell systems. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 1, 4, 339-393.
11. Ors P., Duteurtre B. and Hennequin D., 1990. In Actualités œnologiques 89, 270-74. Dunod. Paris.
12. Ribereau-Gayon P. 1999. Réflexions sur les causes et les conséquences des arrêts de la fermentation alcoolique en vinification. J. Int. Sci. Vigne Vin, 33, 39-48.
13. Silva S., Ramón-Portugal F., Silva P., Teixeira M. F. and Strehaiano, P., 2002. J. Int. Sci. Vigne Vin., 36, 161-167.
14. Taillandier, P., and P. Strehaiano. 1991. The role of malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: substrate consumption and cell growth. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 541-543.
15. Taillandier P., Riba J. P. and Strehaiano P. 1991. Malate degradation by *Schizosaccharomyces* yeasts included in alginate beads. Bioprocess Eng., 7, 141-144.
16. Tanaka H., Irie S. and Ochi H., 1989. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. J. Ferment. Bioeng. 68, 216-219.
17. Yokotsuka K., Otari A., Naitoh A., and Tanaka H. 1993. Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of a high-acid grape must using two immobilized yeast, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic., 44, 371-371.
18. Yokotsuka K., Yajima M., and Matsudo T., 1997. Production of Bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. Am. J. Enol. Vitic., 48, 471-481.