

Développement d'un bio-réactivateur de levures pour une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique

A yeast bio-reactivator for a better control of alcoholic fermentation

RÉSUMÉ La réhydratation des levures sélectionnées, proposées sous forme sèche active (LSA), est une étape fondamentale pour la réussite du levurage. Récemment, des travaux scientifiques ont montré l'intérêt des stérols apportés lors de la phase de réhydratation des LSA. Ces stérols, véritables micro-protectants, permettent en effet une meilleure restructuration de la membrane plasmique levurienne et, par là-même, l'optimisation du déroulement de la fermentation alcoolique. Ainsi, pour protéger les levures sèches actives vis-à-vis des stress de la fermentation alcoolique, nous avons travaillé sur la mise au point d'un bio-réactivateur spécifique de levures. Par sa formulation 100% naturelle, il permet, lors de la réhydratation des LSA, l'apport des éléments essentiels à leur protection, notamment grâce à :

- sa teneur optimale en micro-protectants apportés par les levures inactivées spécifiques issus de la technologie NATSTEP™ ;
- ainsi qu'à la présence d'éléments supports spécifiques.

Cet article présente les résultats des expérimentations menées en laboratoire et en caves qui ont permis la mise au point et la validation de la formulation du bio-réactivateur Pre-FERM®.

MOTS CLÉS

STÉROLS, RÉHYDRATATION DES LSA,
BIO-RÉACTIVATEUR

ABSTRACT The rehydration process of active dry yeasts (ADY) is a fundamental stage for a successful inoculation. Recently, scientific studies have shown the benefit of adding sterols during the rehydration stage of ADY. Indeed, these sterols are real « micro-protectants » and allow for a better restructuring of the yeast plasma membrane. They also improve the course of the alcoholic fermentation. Therefore, in order to protect the selected yeast from the stresses inherent to alcoholic fermentations, we have worked on the development of a specific bio-reactivator for yeasts. Thanks to its 100% natural formula PRE-FERM supplies yeasts with the nutrients essential to their protection by:

- Offering an optimal level of microprotectants provided by the specific inactivated yeasts produced with the NATSTEP™ technology.
- Providing specific supporting elements.

This article presents the results of the laboratory- and winery-scale experimentations that have led to the formulation determination and validation of the bio-reactivator Pre-FERM®.

KEYWORDS

STEROLS, ADY REHYDRATION,
BIO-REACTIVATOR

Aline MARTIN
Nathalie SIECZKOWSKI
Martin VIALATTE
Oenologie, Service R&D
79 av. A.A. Thévenet
B.P. 1031 Magenta
51319 Epernay Cedex
amartin@sofralab.com
03 26 51 56 45



Aline MARTIN

Développement d'un bio-réactivateur de levures pour une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique

54

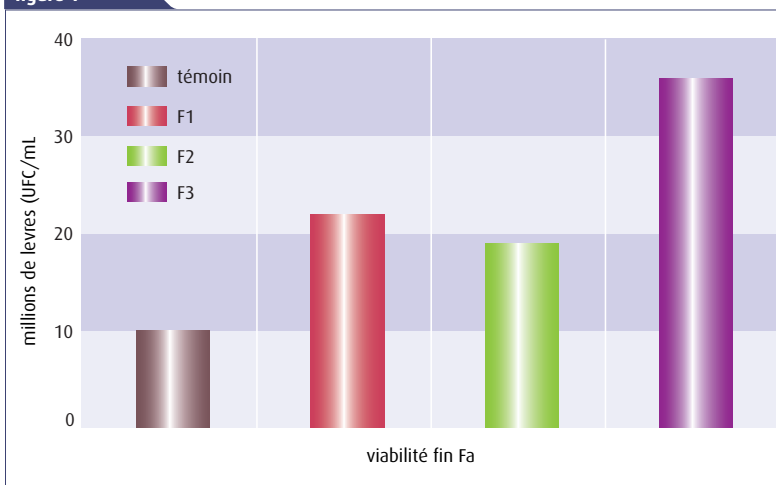


La réhydratation des levures sélectionnées, proposées sous forme sèche active (LSA), est une étape fondamentale pour la réussite du levurage, au-delà du respect des bonnes conditions de réactivation (température de l'eau: 37°C, durée de réhydratation: 15 à 30 mn...). En effet, lors du séchage, la déshydratation des levures provoque une contraction de leur volume intracellulaire, entraînant une déstructuration de leur membrane plasmique. Or, la membrane plasmique constitue pour la levure une barrière indispensable, qui la protège des agressions liées aux paramètres physico-chimiques du moût au cours de la fermentation alcoolique (pH bas, alcool élevé...).

Essai comparatif, microvinifications (moût de Chardonnay), Laboratoire de Microbiologie Martin Vialatte Œnologie. Dénombrement des levures en fin de fermentation alcoolique.

Récemment, des travaux scientifiques ont montré l'intérêt des stérols apportés lors de la phase de réhydratation des LSA. Ces stérols, véritables micro-protectants, permettent en effet une meilleure restructuration de la membrane plasmique levurienne et par là-même, l'optimisation

figure 1



du déroulement de la fermentation alcoolique (Luparia *et al.*, 2004 ; Soubeyrand *et al.*, 2005). Ainsi, si la nutrition des levures sélectionnées est vitale pour assurer le bon déroulement des fermentations alcooliques, la protection des levures lors de leur réactivation est nécessaire pour garantir un meilleur niveau de viabilité cellulaire et une plus forte résistance aux différents stress subis lors de la fermentation alcoolique. Sans protection, la levure naturelle sélectionnée est susceptible d'être agressée lors de la fermentation : carence du milieu en facteurs de survie (stérols et acides gras polyinsaturés), concentration en alcool forte en fin de fermentation alcoolique...

Ces nombreux stress, dont est victime la levure sélectionnée, augmentent les risques de fermentation alcoolique languissante, d'arrêt de fermentation, de production de composés non souhaités (acidité volatile, composés soufrés...) et donc de perte qualitative. Ainsi pour optimiser la réactivation des levures sélectionnées sèches actives, et les protéger vis à vis des stress de la fermentation alcoolique, nous avons travaillé sur la mise au point d'un bio-réactivateur spécifique de levures.

ESSAIS MENÉS EN LABORATOIRE EN VUE DE LA MISE AU POINT DU BIO-RÉACTIVATEUR

• Matériel et méthodes

Afin de mettre au point le bio-réactivateur, nous avons dans un premier temps mis en place des essais comparatifs au sein de notre laboratoire, en conditions de micro-vinifications (1l) et sur des moûts congelés.

Trois formulations expérimentales du bio-réactivateur (F1, F2 et F3) ont été testées, appliquées dans l'eau de réhydratation des LSA. Leurs compositions reposent sur la nature et les proportions respectives de deux types de constituants :

- des levures inactivées spécifiques issues de la technologie NATSTEP™, riches en micro-protectants (stérols et acides gras polyinsaturés spécifiques)

- et des éléments supports spécifiques qui facilitent l'assimilation de ces micro-protectants par la levure lors de la réhydratation.

Compte-tenu de nos objectifs, nous avons choisi deux moûts difficiles présentant les caractéristiques suivantes :

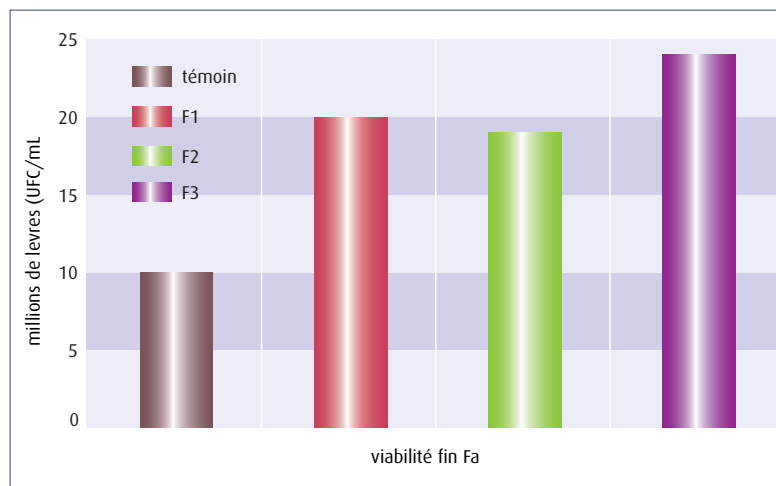


figure 2

Essai comparatif, microvinifications (moût de cabernet-sauvignon), Laboratoire de Microbiologie Martin Vialatte Enologie. Dénombrement des levures en fin de fermentation alcoolique

- moût de chardonnay : turbidité < 30 NTU, TAP = 13 %, pH = 3,09 ;

- moût de cabernet-sauvignon (thermovinification) : TAP = 14 %, pH = 3,60.

Chacun de ces moûts a été réparti en quatre modalités d'essais, menées chacune en duplicata :

- témoin : LSA réhydratées classiquement sans bio-réactivateur,

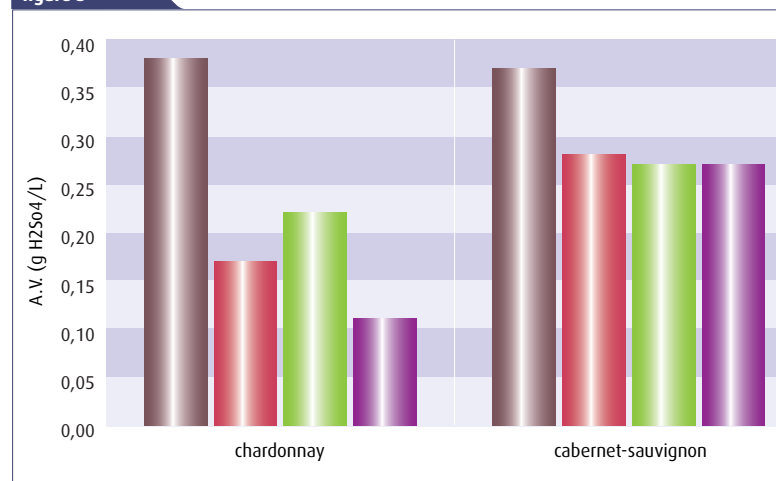
- F1 : LSA réhydratées avec bio-réactivateur F1 (30 g/hl),

- F2 : LSA réhydratées avec bio-réactivateur F2 (30 g/hl),

- F3 : LSA réhydratées avec bio-réactivateur F3 (30 g/hl).

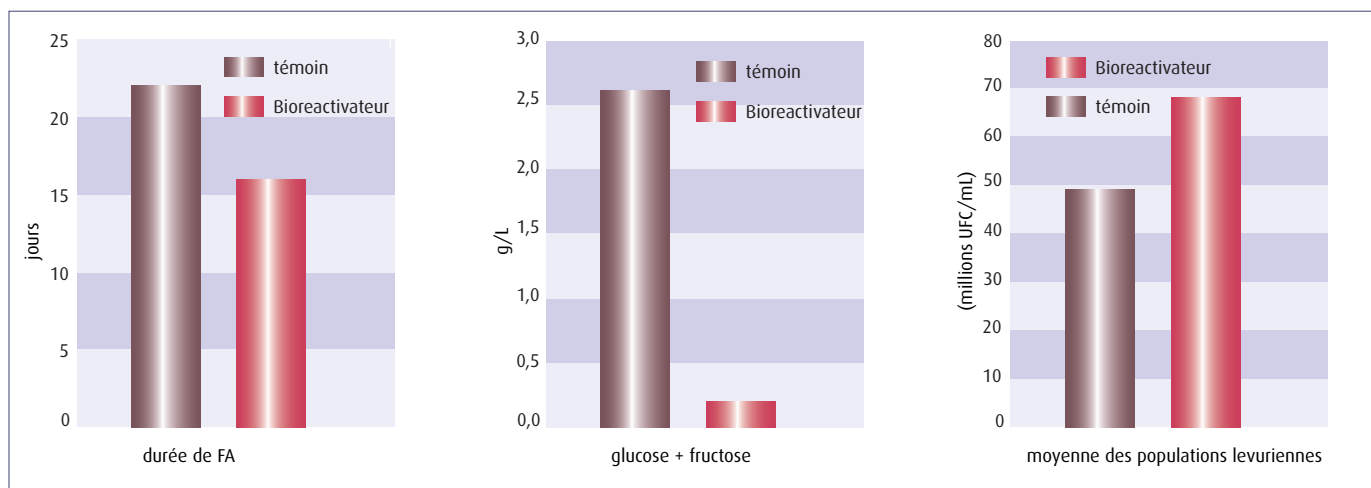
Les fermentations alcooliques (conduites à 18°C) ont été suivies par pesées journalières et mesures de la température. En parallèle, des comptages de levures sur milieu de culture spé-

figure 3



Développement d'un bio-réactivateur de levures pour une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique

56



figures 4, 5 6

cifique ont été réalisés, en particulier en fin de fermentation alcoolique.

Enfin, une analyse chimique complète a été effectuée sur chacune des modalités à l'issue de la fermentation alcoolique.

• Résultats et discussion

En ce qui concerne les cinétiques de fermentation alcoolique, on note un gain de temps de 2 jours sur les modalités où les LSA avaient été réhydratées avec bio-réactivateur, par rapport au témoin.

Ceci s'explique par des niveaux de population levurienne viable plus importantes en fin de fermentation alcoolique, en particulier sur la modalité F3, comme le montrent les figures 1 et 2.

Essai comparatif, minivinifications (moût de Viognier), INRA Pech Rouge.

figure 4: Durées des fermentations alcooliques

figure 5: Quantités de sucres résiduels (glucose + fructose) au bout de 21 jours de fermentation

figure 6: Moyenne des populations levuriennes viables dénombrées pendant la phase stationnaire

Enfin, sur la figure 3, on note une moindre teneur en acidité volatile sur les modalités où les LSA ont été réhydratées avec la formulation de bio-réactivateur F3. Les différences sont d'autant plus marquées au niveau de l'essai réalisé sur le moût de chardonnay, ceci étant probablement lié au niveau de turbidité très faible sur ce moût.

Les résultats de ces essais de micro-vinifications nous ont amenés à pré-sélectionner la formulation F3 pour la suite de nos travaux. Nous nommerons par la suite cette formulation « bio-réactivateur ».

ESSAIS MENÉS EN MINIVINIFICATIONS EN VUE DE LA VALIDATION DE LA FORMULATION RETENUE

• Matériel et méthodes

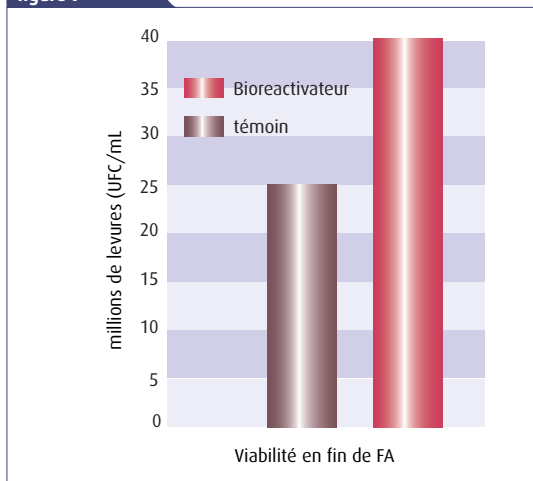
L'essai a été mené à l'INRA de Pech Rouge, au sein de la halle de fermentations différées, sur un moût de viognier difficile, présentant les caractéristiques suivantes: turbidité = 4 NTU, TAP = 13,5%, pH = 3,35, Azote assimilable = 122 mg/l.

Deux modalités d'essai menées en cuves inox de 1 hl ont été mises en place:

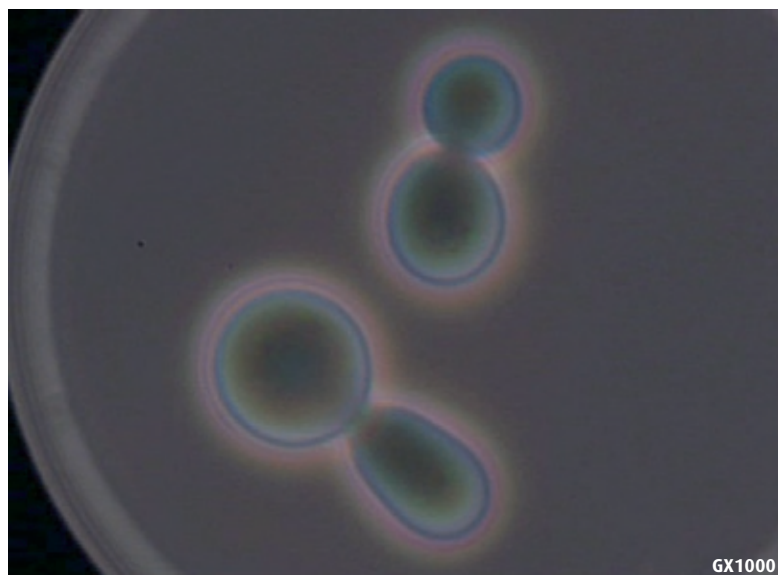
- Témoin: levurage avec LSA réhydratées selon le protocole classique sans Bio-réactivateur,
- Bio-réactivateur: levurage avec LSA réhydratées avec le bio-réactivateur (30 g/hl).

En parallèle, à mi-fermentation, un activateur complexe a été apporté afin d'assurer une bonne nutrition aux levures sélectionnées.

figure 7



Essai comparatif « grand volume » (vinification en blanc, Muscadet). Dénombrement des levures en fin de fermentation alcoolique. Collaboration Martin Vialatte œnologie / LVVD



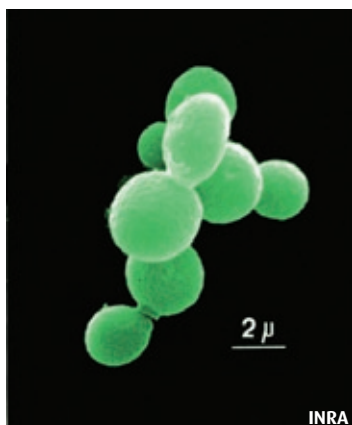
Nous avons choisi de mener ces fermentations à basse température (16°C) afin de nous rapprocher des tendances œnologiques actuelles, visant à l'élaboration de vins blancs aromatiques « modernes ».

Les fermentations alcooliques ont été suivies en ligne par mesure du dégagement de CO₂. En fin de fermentation alcoolique, ces suivis ont été complétés par des dosages enzymatiques journaliers des sucres (glucose + fructose). La fin de la fermentation alcoolique a été déterminée lorsque la teneur en glucose + fructose était inférieure à 2 g/l.

Par ailleurs, des contrôles de la population levurienne ont été réalisés par comptages quotidiens au compteur Coulter, ainsi que par coloration au Bleu de Méthylène visant à déterminer la mortalité des levures.

• Résultats et discussions

La fermentation alcoolique a été nettement plus courte sur la modalité où les LSA ont été réhydratées avec le bio-réactivateur (gain de temps de 6 jours par rapport au témoin), comme le montre la figure 4. Par ailleurs, elle est plus complète sur la modalité « bio-réactivateur » avec une teneur plus faible en sucres résiduels (glucose + fructose) (figure 5).



Cette meilleure performance est à corréler avec un niveau de population viable significativement supérieur pendant la phase stationnaire de la fermentation alcoolique (figure 6). Il est important de noter que les facteurs de survie (dont les stérols et les acides gras polyinsaturés) sont déterminants pendant la phase stationnaire pour les levures. Le bio-réactivateur assure ici un meilleur maintien de la viabilité levurienne en fin de fermentation alcoolique.

ESSAIS MENÉS EN CAVES EN VUE DE LA VALIDATION DU BIO-RÉACTIVATEUR EN CONDITIONS RÉELLES DE VINIFICATION

• Matériel et méthodes

Durant les vendanges 2005, des essais ont été mis en place en conditions industrielles de cave, en région Muscadet, en collaboration avec LVVD. Nous avons sélectionné deux caves. Sur chacun des sites, un essai comparatif a été suivi sur moût de melon de Bourgogne, selon deux modalités de réhydratation des levures :

- cuve « témoin » : LSA réhydratées classiquement,
- cuve « Bio-réactivateur » : LSA réhydratées avec le bio-réactivateur (30 g/hl).

Les essais ont été menés en conditions réelles de vinification en cave, sur des cuves inox de 50 hl. Le déroulement des fermentations alcooliques a été suivi par mesure journalière de la densité et de la température des moûts. La population levurienne a été suivie durant la fermentation alcoolique par dénombrement sur milieu de culture spécifique. Enfin, une analyse chimique complète a été réalisée sur moût avant le levurage et sur vin en fin de fermentation alcoolique.

• Résultats et discussion

Sur les deux sites, nous avons pu mettre en évidence l'impact positif de l'apport du bio-réactivateur lors de la réhydratation des levures sélectionnées sur le déroulement de la fermentation alcoolique. Nous avons en effet noté sur les modalités « Bio-réactivateur » une amélioration des performances de la levure (durée de fermentation alcoolique et qualité des vins finis), permise par un niveau de viabilité levurienne supérieur en fin de fermentation alcoolique, comme le montre la figure 7.

Développement d'un bio-réactivateur de levures pour une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique

58



CONCLUSION

Les différents travaux menés à différentes échelles, du laboratoire à la cave, nous permettent aujourd'hui de mettre à la disposition des vinificateurs un outil de bio-réactivation des levures afin d'optimiser le déroulement de cette transformation primordiale qu'est la fermentation alcoolique. En fournissant à la levure sèche active, lors de la réhydratation, ses microprotectants spécifiques (stérols et acides gras insaturés), le bio-réactivateur PRE-FERM® permet de renforcer la membrane plasmique de la levure vis-à-vis des stress rencontrés, notamment en fin de fermentation alcoolique.

Les nombreux tests effectués en laboratoire, et les divers essais réalisés en cave, en conditions réelles de vinifications, démontrent les intérêts du bio-réactivateur sur le comportement des levures sélectionnées et le déroulement des fermentations alcooliques avec :

- une meilleure reprise d'activité levurienne, facilitant la colonisation du milieu par les levures sélectionnées ;
- une meilleure viabilité et activité levurienne jusqu'au terme de la fermentation alcoolique, assurant une fermentation alcoolique plus rapide, et plus sûre ;
- enfin, une meilleure qualité organoleptique des vins (moindre production d'acidité volatile par la levure en conditions difficiles).

L'utilisation du bio-réactivateur est particulièrement intéressante dans le cas de certaines conditions œnologiques limitantes pour *Saccharomyces cerevisiae* :

- moûts fortement clarifiés (connus pour être fortement carencés en stérols),
- fermentation à basse température (conditions difficiles pour la levure),
- moûts à forte maturité (TAP élevé),
- moûts issus de vendanges à faible état sanitaire (risques de contaminations par des flores indigènes indésirables),
- lors de l'élaboration d'un pied de cuve en vue d'une reprise de fermentation,
- lors de la réalisation des levains de prise de mousse dans le cadre de l'élaboration de vins effervescents.

BIBLIOGRAPHIE

- Luparia V., Soubeyrand V., Berges T., Julien A. & Salmon J.M. (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 25-32.
- Soubeyrand V., Luparia V., Williams P., Doco T., Vernhet A., Ortiz-Julien A., & Salmon J.-M. (2005). Formation of micella containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermenting capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8025-8032.