

Amélioration de la performance des levures œnologiques avec la méthode fed-batch

Charles FROHMAN¹, Danielle WIDMER² et Ramón MIRA DE ORDUÑA HEIDINGER²

¹Takasago International Corporation, Rockleigh, NJ, USA

²Changins | Haute école de viticulture et œnologie, 1260 Nyon, Suisse

Renseignements: Ramón Mira de Orduña Heiding, e-mail: ramon.mira@changins.ch, tél. +41 22 363 40 86, www.changins.ch



Danielle Widmer, étudiante du Master MLS Viticulture et Œnologie de Changins, avec le nouveau spectromètre proche infrarouge (Bruker MPA), qui sera utilisé à l'avenir pour l'automatisation des fermentations œnologiques et d'autres analyses du vin.

Introduction

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a une place prédominante parmi les organismes de production industrielle grâce à sa tolérance aux pH bas, aux hautes concentrations d'éthanol et à sa capacité de croître en milieu anaérobie (Nevoigt 2008). En œnologie, *S. cerevisiae* assure la stabilité microbiologique par sa production d'éthanol, mais contribue aussi de façon fondamentale à la qualité organoleptique du produit final. Notamment, certains composants aromatiques sont produits pendant la fermentation, soit favorables comme les esters volatils aux arômes fruités ou floraux,

soit moins souhaités comme l'acide acétique ou le sulfure d'hydrogène, qui peuvent nuire à la qualité, voire rendre les vins inconsommables.

Cette situation se présente surtout lorsque les levures subissent des stress pendant la fermentation, qui engendrent la production de ces composés, ou même des arrêts de fermentation. Les facteurs de stress les plus significatifs pour *S. cerevisiae* sont la température, les concentrations en sucres et en alcool. La réponse de *S. cerevisiae* au stress hyperosmotique causé par des hautes concentrations en sucres a été amplement étudiée dans le cadre des fermentations œnologiques (Bely *et al.* 2005; Erasmus *et al.* 2004; Ferreira *et al.*

2006). Le stress hyperosmotique cause une sur-régulation des gènes de la voie métabolique glycolytique et de la voie pentose phosphate (Erasmus *et al.* 2003), induisant une augmentation de produits secondaires du métabolisme levurien, comme l'acétaldéhyde et l'acide acétique, qui peut atteindre 1,5 g/l dans certains vins (Erasmus *et al.* 2004; Kontkanen *et al.* 2004; Nurgel *et al.* 2004; Pigeau et Inglis 2005a).

Précédemment, les moûts riches en sucres étaient surtout produits dans les régions à climat chaud, mais aussi dans des régions septentrionales pour des vins issus de raisins partiellement ou entièrement passerillés, comme les vendanges tardives, vins de glace, des Auslese, etc. Ces dernières années, cependant, le réchauffement climatique tend à accroître de façon plus générale les problèmes de fermentation liés aux taux de sucres excessifs dans les moûts (Mira de Orduña 2010).

Pour réduire le stress hyperosmotique, les concentrations en sucre devraient être limitées pendant la fermentation. Ce résultat pourrait être obtenu en ajoutant le moût lentement et de façon continue à un pied de cuve, permettant ainsi aux levures de consommer le sucre au moment de son addition, au lieu d'ajouter les levures au moût comme habituellement. Cette approche est appelée «fed-batch» (de l'anglais *feeding*, pour alimenter).

Ce travail avait pour but d'étudier l'application d'une méthode fed-batch à la fermentation d'un moût blanc riche en sucres. Afin de bien identifier les différences éventuelles entre une fermentation traditionnelle (batch) et la variante fed-batch, un moût de Chardonnay a été chaptalisé à une très haute concentration en sucres (340 g/l).

Matériel et méthodes

Un moût de Chardonnay (pH 3,25, AT 10 g/l) a été stérilisé par filtration et chaptalisé à 340 g/l de sucres avec du fructose et du glucose (50:50). La nutrition levurienne a été assurée par ajout d'un nutriment complexe (Fermaid K, 0,25 g/l) et de phosphate d'ammonium (0,25 g/l). Dans les deux variantes, les levures ont été inoculées à raison de 0,4 g/l du volume initial de la fermentation. Pour la fermentation traditionnelle (batch), les levures ont été inoculées après réhydratation dans la totalité du moût. Pour la variante fed-batch, une petite quantité de moût a été mélangée avec les levures réhydratées pour réduire la concentration en sucres à 160 g/l. Puis, la fermentation a réduit la concentration à 50 g/l de sucres. Dès ce moment, le moût restant a été ajouté lentement durant la fermentation. Le débit de l'ajout a été adapté à la vitesse de la

Résumé ■ Les hautes teneurs en sucres provoquent un stress hyperosmotique chez les levures *Saccharomyces cerevisiae*, qui augmente la formation d'acide acétique et d'acétaldéhyde, ainsi que le risque d'arrêts de fermentation. Dans cette étude, une fermentation traditionnelle (méthode batch) d'un moût à très haute concentration en sucres (340 g/l) a été comparée à une méthode fed-batch où le même moût a été ajouté à une vitesse adaptée pour maintenir la concentration en sucres à 50 g/l pendant la fermentation. Les deux variantes ont présenté des teneurs finales similaires en éthanol mais, en cours de fermentation, la méthode fed-batch a fourni de meilleurs taux de production d'éthanol, associés à une meilleure viabilité des levures. En outre, les concentrations résiduelles en acide acétique et en acétaldéhyde étaient significativement plus basses après la fermentation fed-batch. La stratégie fed-batch visant à maintenir une concentration en sucres basse et constante pourrait ainsi contribuer au succès et à l'efficacité de la fermentation et à réduire la formation de métabolites associés au stress hyperosmotique de *S. cerevisiae*. Des études sont actuellement en cours à Changins pour automatiser cette technique et obtenir plus de données sur son application.

consommation des sucres pour maintenir la concentration à 50 g/l. Afin d'assurer cette constance, les teneurs en sucres ont été quantifiées dans des échantillons pris toutes les 10–15 minutes.

La viabilité des levures a été testée par cytométrie en flux (Accuri C6). L'analyse des autres composants a été assurée par méthode chromatographique (sucres, alcool, acides) et enzymatique (acétaldéhyde).

Résultats

La figure 1 montre la cinétique des concentrations de sucres fondamentalement différente entre les deux variantes. Dans la variante batch, la concentration en sucres a baissé graduellement à partir d'une valeur initiale de 340 g/l. Dans la variante fed-batch, après une phase initiale de fermentation libre, le contrôle constant de la teneur en sucres et les variations du débit de la pompe de moût ont maintenu la concentration à 50 g/l tout au long de la fermentation.

Comme prévu, les deux fermentations se sont achevées avant que tous les sucres soient consommés (fig.1), à cause du taux d'alcool potentiel du moût de ~22 % (vol.). Les concentrations finales en éthanol ont été similaires dans les deux variantes (tabl.1). Cependant, la variante fed-batch a montré une meilleure cinétique de production d'éthanol (tabl.1 et fig.1), bien corrélée avec la viabilité plus élevée des levures dans cette variante (fig. 2). En plus de leur nombre supérieur, les levures de la variante fed-batch se sont aussi caractérisées par une phase de mort plus lente (fig. 2).

La figure 3 illustre l'effet fondamental de la méthode fed-batch sur le métabolisme des levures et la production de métabolites associés au stress hyperosmotique. Avec une formation d'acide acétique initiale comparable dans les deux procédés, une partie de l'acide acétique a été réutilisée dès le début de l'ajout contrôlé de moût dans la variante fed-batch. Les concentrations d'acide acétique sont ensuite restées constantes, se traduisant par des valeurs finales de 80 % inférieures à celles de la variante batch (tabl.1).

La cinétique des concentrations d'acétaldéhyde a été similaire dans les deux variantes (fig. 3). Cependant, dans la variante batch, la concentration maximale et la valeur finale d'acétaldéhyde étaient deux fois plus élevées que dans la variante fed-batch (tabl.1).

Discussion

L'ajout de levures réhydratées au moût constitue toujours un stress considérable pour ces microorganismes, accru lors de haute concentration en sucres du moût. L'ajout de moût lent et contrôlé (fed-batch) à un pied de cuve de levure fait apparaître des différences fondamentales dans la cinétique de métabolites et la viabilité des levures par rapport à la méthode traditionnelle (batch).

Même si les concentrations finales en éthanol étaient similaires dans les vins des variantes batch et fed-batch, les taux de formation d'éthanol étaient plus élevés dans le procédé fed-batch. Ce résultat, corrélé avec le nombre supérieur de levures viables, confirme ceux de Nagodawithana *et al.*(1974) qui ont démontré qu'une réduction des concentrations en sucres augmentait la viabilité de *S. cerevisiae* pendant la fermentation alcoolique.

Des hautes teneurs en sucres sont associées à une formation accrue d'acide acétique par *S. cerevisiae* (Michnick *et al.* 1997; Pigeau et Inglis 2005a; Pigeau et Inglis 2007; Pigeau et Inglis 2005b). Dans cette étude, la teneur finale en acide acétique après fermentation traditionnelle était effectivement très élevée, proche ou légèrement supérieure aux limites légales de la majori-

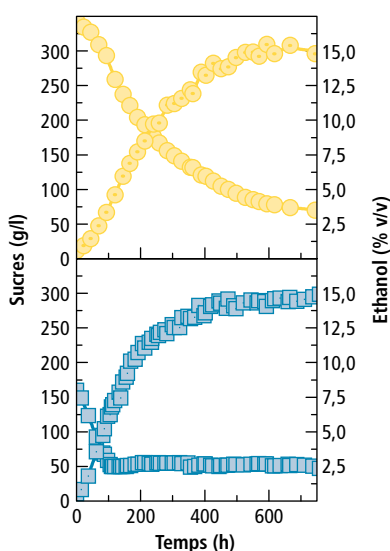


Figure 1 | Cinétique des concentrations des sucres et de l'éthanol.

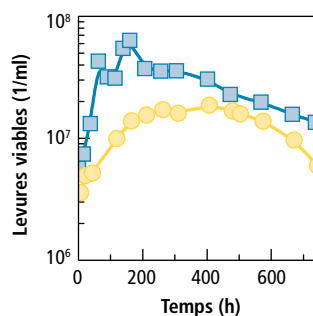


Figure 2 | Nombre de levures viables.

Fermentations batch (●) et fed-batch (■) d'un moût de Chardonnay chaptalisé à 340 g/l de sucres.

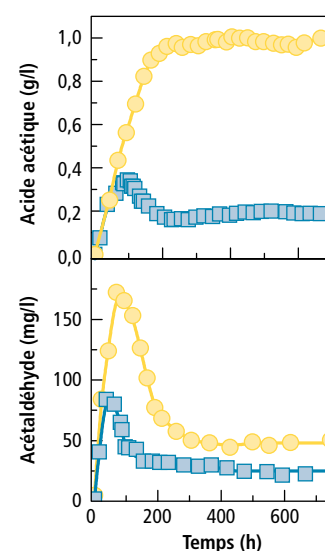


Figure 3 | Cinétique des concentrations d'acide acétique et d'acétaldéhyde.

Tableau 1 | Concentrations en éthanol, acide acétique et acétaldéhyde dans les vins après la fin de la fermentation

	Durée (h)	Ethanol (% v/v)	Taux de formation d'éthanol max. (‰ (v/v)/h)	Acide acétique (mg/l)	Acétaldéhyde (mg/l)
Batch	666 ± 25 ^a	14,8 ± 0,29 ^a	0,45 ± 0,02 ^a	1000 ± 25 ^a	49 ± 2 ^a
Fed-batch	543 ± 10 ^b	14,9 ± 0,10 ^a	0,7 ± 0,07 ^b	190 ± 8 ^b	22 ± 2 ^b

Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives à p = 0,05.

té des pays. Plusieurs chercheurs ont établi que *S. cerevisiae* pouvait utiliser l'acide acétique lorsque les teneurs en glucose étaient basses (1–50 g/l) (Moreira dos Santos *et al.* 2003; Vilela-Moura *et al.* 2008). Dans la variante fed-batch, l'acide acétique a été effectivement réutilisé, ce qui se traduit par une concentration finale cinq fois inférieure à celle de la variante traditionnelle.

L'acétaldéhyde (éthanal) est le composant carbonyle quantitativement le plus important du vin et exerce un effet sur l'arôme, la couleur et la stabilité microbiologique (Liu et Pilonne 2000). De hautes teneurs en acétaldéhyde dans le vin nécessitent de fortes doses de sulfites (SO₂) pour assurer la qualité microbiologique et organoleptique des vins (Boulton *et al.* 1996; Jackowetz *et al.* 2012). Il a été démontré que les hautes concentrations en sucres augmentent la production d'acétaldéhyde des levures (Li et Mira de Orduña 2011), ce que confirment les résultats de cette étude. L'ajout de moût lent et contrôlé (méthode fed-batch) à un pied de cuve de levures a considérablement réduit la teneur finale en acétaldéhyde dans le vin, une réduction qui correspondrait à une diminution de sulfites combinés (à l'acétaldéhyde) de près de 40 mg/l.

Conclusions

- Cette étude prouve que, pour les moûts à haute concentration en sucres, l'application d'une stratégie fed-batch visant à maintenir les concentrations en sucre basses et constantes pendant la fermentation peut augmenter la viabilité des levures et réduire de façon significative la production de métabolites associés à leur réponse au stress.
- Les changements observés ont un impact sur le plan œnologique.
- Cependant, le contrôle manuel constant des teneurs en sucres exigé par la méthode fed-batch est irréaliste dans un contexte industriel.
- Des travaux sont ainsi programmés à Changins pour automatiser ce procédé, de même que des études plus approfondies sur l'effet des fermentations fed-batch sur la composition et la qualité organoleptique des vins. ■

Bibliographie

- Bely M., Masneuf-Pomaredo I. & Dubourdieu D., 2005. Influence of physiological state of inoculum on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **39** (4), 191–197.
- Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F. & Kunkee R. E., 1996. Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall, New York, 604 p.
- Erasmus D. J., Cliff M. A. & van Vuuren H. J. J., 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *Am. J. Enol. Vitic.* **55** (4), 371–378.
- Erasmus D. J., van der Merwe G. K. & van Vuuren H. J., 2003. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.* **3** (4), 375–399.
- Ferreira J., du Toit M. & du Toit W. J., 2006. The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. *Austr. J. Grape Wine Res.* **12** (1), 50–56.
- Jackowetz J. N., Li E. & Mira de Orduña R., 2012. Sulphur dioxide content of wines: the role of winemaking and carbonyl compounds. *Practical Winery & Vineyard Winter*, 38–49.
- Kontkanen D., Inglis D. L., Pickering G. J. & Reynolds A., 2004. Effect of yeast inoculation rate, acclimatization, and nutrient addition on icewine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **55** (4), 363–370.
- Li E. & Mira de Orduña R., 2011. Evaluation of the acetaldehyde production and degradation potential of 26 enological *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast strains in a resting cell model system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38** (9), 1391–1398.
- Liu S.-Q. & Pilonne G. J., 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**, 49–61.
- Michnick S., Roustan J. L., Remize F., Barre P. & Dequin S., 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* **13** (9), 783–793.
- Mira de Orduña R., 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* **43** (7, Climate Change and Food Science), 1844–1855.
- Moreira dos Santos M., Gombert A. K., Christensen B., Olsson L. & Nielsen J., 2003. Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using ¹³C-labeled substrates. *Eukaryot Cell* **2** (3), 599–608.
- Nagodawithana T. W., Castellano C. & Steinkraus K. H., 1974. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. *J. appl. Microbiol.* **28** (3), 383–391.
- Nevoigt E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. mol. Biol. Rev.* **72** (3), 379–412.
- Nurgel C., Pickering G. J. & Inglis D. L., 2004. Sensory and chemical characteristics of Canadian ice wines. *J. Sci. Food Agric.* **84** (13), 1675–1684.
- Pigeau G. M. & Inglis D. L., 2005a. Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during Icewine fermentation. *J. appl. Microbiol.* **99** (1), 112–125.
- Pigeau G. M. & Inglis D. L., 2007. Response of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during Icewine fermentation. *J. appl. Microbiol.* **103** (5), 1576–1586.
- Pigeau G. & Inglis D., 2005b. Yeast metabolic implications of icewine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **56** (4).
- Vilela-Moura A., Schuller D., Mendes-Faia A. & Côte-Real M., 2008. Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80** (5), 881–890.

■ Summary

Improvement of yeast performance by application of fed-batch fermentations in enology

High must sugar concentrations lead to a hyperosmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae* increasing the formation of acetic acid and acetaldehyde, as well as the risk of fermentation failures. This work compared the traditional batch fermentation of a very high sugar containing grape juice (340 g/l) with a fed-batch fermentation where the same juice was added at such rates as to keep sugar concentrations constant at 50 g/l during the fermentation. In both treatments, the final ethanol concentrations were similar, but higher ethanol formation rates were obtained in the fed-batch fermentations that were associated with increased yeast viability. Significantly less acetic acid and acetaldehyde remained after fed-batch fermentations. The implementation of fed-batch fermentations at low and constant substrate concentrations may be a suitable technique for increasing fermentation success and efficiency and decreasing byproduct formation in alcoholic fermentations by *S. cerevisiae*. Current studies at Changins will further investigate the application of this technique and its automation.

Key words: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic fermentation, wine, hyperosmotic stress, fed-batch.

■ Zusammenfassung

Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Hefe in der Önologie durch Anwendung der fed-batch Technik

Hohe Mostzuckergehalte führen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu hyperosmotischem Stress und in der Folge zu erhöhter Bildung von unerwünschten Gärungsnebenprodukten wie Essigsäure und Acetaldehyd (Ethanal), und einer grösseren Wahrscheinlichkeit von Gärstörungen. Ziel dieser Arbeit war es, die traditionelle Gärung (Batch Fermentation) eines Mostes mit hohem Zuckergehalt (340 g/l) mit einer fed-batch Gärung zu vergleichen. Bei der fed-batch Variante wurde die kontinuierliche Zugabe des selben Mostes derart variiert, dass die Zuckerkonzentration während der Gärung bei 50 g/l konstant blieb. Keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Endethanolkonzentration konnten beobachtet werden. Aufgrund erhöhter Hefelevensfähigkeit im Fed-batch Verfahren konnten jedoch höhere Ethanolbildungsraten in dieser Variante gemessen werden. Weiterhin führte das Fed-batch Verfahren zu signifikant tieferen Gehalten an Essigsäure und Acetaldehyd. Der Einsatz einer fed-batch Vergärungstechnik bei konstant tiefen Zuckergehalten könnte in der Praxis die Gärungssicherheit und -effizienz erhöhen und die Bildung von unerwünschten Gärungsnebenprodukten minimieren. Derzeitige Studien in Changins haben sich zum Ziel gesetzt das Verfahren zu automatisieren und weiter zu untersuchen.

■ Riassunto

Miglioramento dell'efficienza del lievito attraverso la tecnica fed-batch in enologia

Elevati tenori zuccherini nel mosto causano nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* uno stress iperosmotico e, di conseguenza, una maggiore formazione di prodotti di fermentazione secondari indesiderati quali l'acido acetico e acetaldeide e possibili arresti di fermentazione. Lo scopo del presente lavoro era di confrontare la fermentazione tradizionale (fermentazione batch) di un mosto con elevato tenore zuccherino (340 g/l) con una fermentazione fed-batch. Nella variante fed-batch si è variato continuamente l'aggiunta dello stesso mosto in modo che la concentrazione durante la fermentazione rimanesse costante a 50 g/l. Non si sono osservate differenze significative relative alla concentrazione finale di etanolo. A causa della migliore capacità di sopravvivenza del lievito nel procedimento fed-batch sono stati misurati dei tassi maggiori di formazione di etanolo. Il procedimento fed-batch ha, inoltre, portato a un tenore significativamente inferiore in acido acetico e acetaldeide. L'impiego di una tecnica di fermentazione fed-batch con tenori zuccherini costantemente bassi potrebbe aumentare, nella pratica, la sicurezza ed efficienza della fermentazione e ridurre la formazione di prodotti di fermentazione secondari indesiderati. Attualmente gli studi a Changins si sono posti come obiettivo l'automatizzazione del procedimento e ulteriori verifiche.