

Lina DAWOD¹, Charles WAFFELAERT², Vincent GENTY¹

¹Amarok Biotechnologies, Saint Malo, France, ²Q-Wine Bureau, Barcelone, Espagne

Introduction

La fermentation alcoolique, indispensable du processus de vinification, consiste en la métabolisation du sucre contenu dans les raisins en éthanol par des levures (très souvent *Saccharomyces cerevisiae*). Un suivi rigoureux de cette étape est donc primordial afin de s'assurer de son bon déroulement. Néanmoins, la pratique de routine dans les chais étant différente de celle utilisée dans les laboratoires, les techniques utilisées se doivent d'être simples, peu coûteuses et rapides. Très généralement, une simple mesure de la masse volumique à l'aide d'un mustimètre suffit à donner l'évolution de la fermentation d'un vin par méthode indirecte.

L'utilisation d'une méthode prédictive permettant la caractérisation directe de l'état physiologique des levures en temps réel représente pour les producteurs un nouveau paradigme pour suivre leur fermentation. Elle permettrait d'avoir un maximum d'informations extemporanées sur le déroulement de celle-ci dans le but de l'optimiser et permettre aux vinificateurs de suivre, anticiper et piloter au mieux ce process.

Dans ce projet, un suivi de routine de la fermentation alcoolique a été réalisé sur plusieurs cuves *via* la mesure de la densité et par l'étude de la viabilité et de la vitalité des *Saccharomyces cerevisiae* par cytométrie en flux. Un certain nombre d'écueils ont pu être décelés pour une optimisation du suivi, et la puissance de cette méthode simple a été démontrée dans de nombreux cas réels.

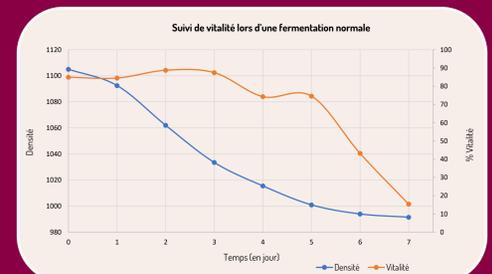
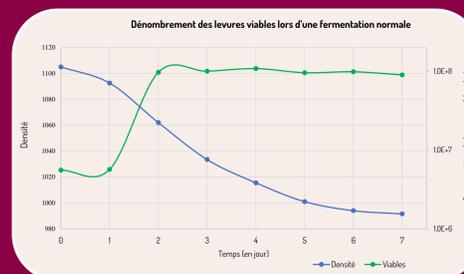


Mustimètre utilisé pour mesurer la densité des moûts

Résultats

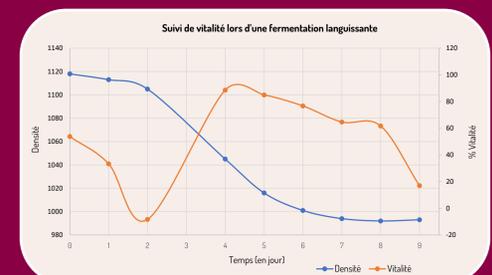
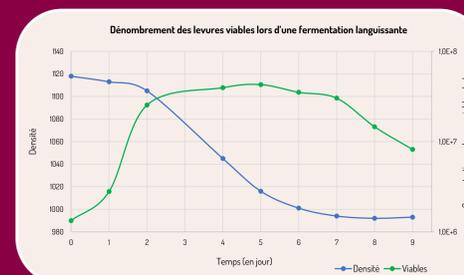
5 Suivi d'une fermentation normale

Lors d'une fermentation induite par l'inoculation de levures ayant une bonne vitalité, une croissance cellulaire immédiate est observée, corrélée à une perte de densité due à la production d'alcool. Néanmoins, le simple comptage des cellules viables ne permet pas d'anticiper la fin de la fermentation. Cette prédiction repose sur la mesure de vitalité, paramètre plus pertinent car sa chute rapide indique la fin de la capacité des levures à produire de l'énergie et donc l'arrêt de la fermentation.



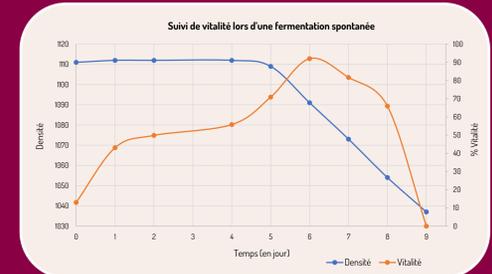
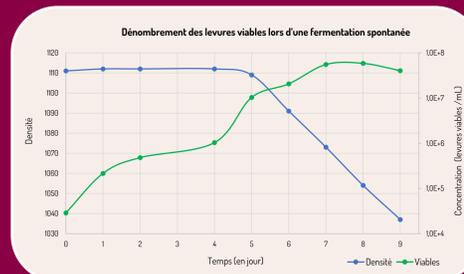
6 Suivi d'une fermentation languissante

Dans ce cas de figure, il est observable que la fermentation n'a pas démarré immédiatement après inoculation. Malgré la bonne prolifération des levures dans la cuve (viabilité), l'analyse parallèle de la vitalité indique que les levures ont utilisé leur stock d'énergie. Cette baisse de la vitalité explique la faible diminution de la densité et le délai de début de fermentation. Toutefois, une fois acclimatées au milieu, la fermentation se déroule aussi rapidement qu'en conditions normales. On note cependant une perte de vitalité plus rapide entraînant une mortalité des levures plus rapide en fin de fermentation alcoolique.



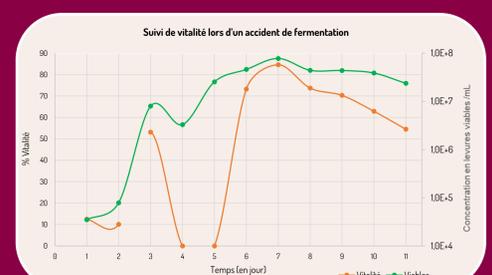
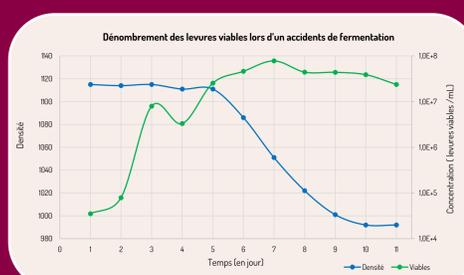
6 Suivi d'une fermentation spontanée

Une fermentation est dite spontanée lorsqu'elle est induite par la flore indigène présente dans les chais. Cette installation peut être plus ou moins longue et comme observée ici, la production de biomasse ne s'accompagne pas toujours d'une fermentation alcoolique efficace. Tout semble indiquer qu'il faut une concentration suffisante de levures (>10⁷ levures viables / mL) disposant d'un niveau énergétique suffisant pour enclencher le processus de fermentation. La mesure de la vitalité semble la plus indicative de l'épuisement de la souche et de l'arrêt de fermentation.



6 Suivi d'accidents de fermentation

Dans le cas présenté, une première fermentation est initiée par l'espèce *Pichia* est sans succès. Il a alors été décidé d'inoculer une nouvelle population de *Saccharomyces* (jour 4). Cependant, celle-ci va également peiner à s'implanter et comme on peut le voir, bien que la concentration en levures soit satisfaisante, son niveau d'énergie trop faible va également retarder le démarrage de la fermentation.



Matériels et Méthodes

Ces résultats ont été obtenus durant le suivi de plusieurs cuves dans des domaines en conditions réelles. La densité a été suivie à l'aide d'un mustimètre. La méthode est basée sur la différence de densité entre le sucre dissous, l'eau et l'alcool à une température donnée. Le plongeur est immergé dans une éprouvette remplie de vin et la graduation lue est reportée sur une abaque de corrélation en fonction de la température.

Levia Test comptage et mesure de la viabilité : le protocole de mesure utilisé dans le kit est appliqué et repose sur l'activité enzymatique des levures.

Levia Test mesure de la vitalité : le protocole de mesure utilisé dans le kit est appliqué. Le temps de *pulse* est maintenu à 20 minutes et le temps de *chase* est de 15 minutes, ce qui permet de mesurer le taux d'excrétion grâce à l'équation : Vitalité % = [1 - (MF12 / MF11)] x 100.

Cytomètres en flux : tous les domaines sont équipés avec un cytomètre Easycyte™ 5SL de chez Luminex Corporation

Conclusion

La réalité de fonctionnement dans les chais est différente de celles des laboratoires. Un suivi rapide est recherché mais la nécessité d'un minimum de compétences a évolué avec l'arrivée au sein des domaines de jeunes ingénieurs qui souhaitent allier tradition, savoir-faire et modernité.

La mesure de la densité qui est la solution la plus simple et la moins onéreuse ne permet pas de détailler les causes d'un retard ou d'un arrêt de fermentation, pas plus qu'elle ne permet d'anticiper la situation.

L'utilisation de la cytométrie en flux, avec des protocoles adaptés à l'utilisateur et à ses conditions de travail permet d'apporter de nouvelles informations dans le pilotage.

L'utilisation du paramètre de vitalité est le plus difficile à maîtriser au domaine, car il nécessite une plus grande rigueur de suivi de protocole pour que les données soient corrélées. Cela implique une formation adaptée en fonction du personnel opérant, ce qui n'est pas toujours facile à mettre en œuvre.