

UTILISATION DE LEVURES INCLUSES POUR LE TRAITEMENT DES ARRÊTS DE FERMENTATIONS

USE OF ENCAPSULATED YEAST FOR THE TREATMENT OF STUCK AND SLUGGISH FERMENTATIONS

Sofia SILVA¹, F. RAMON PORTUGAL¹, Patricia SILVA¹,
Maria de Fatima TEXEIRA¹ et *P. STREHAIANO²

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

2 : Laboratoire de Génie Chimie UMR CNRS 5503, INP-ENSIACET
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France

Résumé : Des cellules de *S. cerevisiae* immobilisées dans des billes de gel d'alginate ont été utilisées pour traiter des arrêts de fermentation en vinification. Les levures immobilisées ont été préalablement acclimatées au milieu alcoolique lors de l'étape d'encapsulation. Le protocole pour relancer les arrêts de fermentations alcooliques comporte deux étapes successives : premièrement, réhydratation et activation des levures immobilisées dans des sacs perméables, deuxièmement, introduction des sacs contenant les levures dans la cuve présentant un arrêt de fermentation. Lorsque les sucres fermentescibles ont été complètement consommés ou atteignent la concentration souhaitée, les sacs contenant les levures immobilisées sont retirés de la cuve de fermentation. Cette méthode a donné d'excellents résultats dans des conditions réelles de vinification. De plus, ce protocole présente l'avantage d'être d'une grande simplicité de mise en œuvre et d'assurer une parfaite maîtrise de l'activité des levures.

Summary : In this work, encapsulated whole cells of *S. cerevisiae* in calcium-alginate gel (*S. cerevisiae*-CAG) were used for the treatment of sluggish and stuck fermentation in vinification. *S. cerevisiae*-CAG can be applied into the must grape and then they can be withdrawn easily at the end of alcoholic fermentation. For the treatment of sluggish and stuck fermentations, *S. cerevisiae*-CAG were applied following two steps: firstly *S. cerevisiae*-CAG were introduced into permeable bags and they were activated in a liquid medium; secondly, after an activation period of eight hours, the immobilized yeast cells were introduced into the fermentation tank. In this work, the obtained results for the treatment of sluggish and stuck fermentations in several French and Portuguese wineries are presented. Preliminary results obtained in micro-vinification conditions have shown that the use of immobilized yeast was better than traditional method (which uses free cells) for the treatment of stuck and sluggish fermentations. The large success rate of immobilized yeast can be explained by one adaptation step of yeast cells to high ethanol concentrations during the immobilization process. The application of immobilized cells of *S. cerevisiae* under real conditions of vinification has shown a consumption rate of 2.8 g/L per day of reducing sugar with a concentration of 5 million of viable cells per mL. It was never observed any increase of the volatile acidity or of other undesirable compounds.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, arrêts de fermentation, levures incluses, vinification

Key words : *Saccharomyces cerevisiae*, stuck fermentation, encapsulated yeast, winemaking.

INTRODUCTION

Lors de l'élaboration de vins rouges ou blancs, la consommation totale des sucres fermentescibles est dans la majorité des cas jugée indispensable. La concentration résiduelle tolérée par les différentes appellations peut varier, néanmoins, dans la plupart des cas en Europe, la concentration finale des sucres réducteurs ne doit pas dépasser 2 g/L pour les vins rouges et 4 g/L pour les vins blancs secs. Il peut arriver cependant que l'activité fermentaire de la population levurienne cesse

alors que la concentration résiduelle de sucres est encore au-dessus de la limite établie par l'appellation. Dans ce cas d'arrêt de fermentation, les risques de développement de bactéries lactiques sont importants et le producteur devra traiter la cuve arrêtée afin de relancer la fermentation. Ainsi, indépendamment des critères définis par chaque appellation, d'un point de vue de la stabilité microbiologique du vin, une réduction maximale des sucres fermentescibles est toujours souhaitable afin d'éviter des risques de contamination par des bactéries ou des levures indésirables qui pourraient

transformer les sucres résiduels fermentescibles en augmentant ainsi l'acidité volatile du vin (Van VUUREN and DICKS, 1993).

En vinification, la majeure partie des sucres fermentescibles sont transformés en alcool par une population levurienne en phase stationnaire, donc dans un état physiologique médiocre (DELIA-DUPUY and STREHAIANO, 1996).

Les causes exactes d'un arrêt de fermentation alcoolique lors de cette phase sont encore mal établies. Cependant diverses hypothèses ont été avancées :

- Les carences nutritives. Parmi elles, on peut mentionner une faible concentration en azote assimilable, de fortes conditions anaérobies provoquées par une absence d'oxygène dissous dans le moût de raisin, des concentrations insuffisantes de thiamine et de faibles concentrations en certains minéraux comme le magnésium ou même l'élimination des bourbes fines (dans le cas de vinification en blanc) rendant le moût déficient en acides gras insaturés et en stérols ; en effet la présence de ces composés accroît la résistance des levures à l'éthanol (ALEXANDRE and CHARPENTIER, 1998 ; BATAILLON *et al.*, 1996 ; BISSON, 1999 ; INGLEDEW and KUNKEE, 1985 ; JULIEN *et al.*, 2000 ; KUDO *et al.*, 1998 ; MONTEIRO and BISON, 1991 ; SABLAYROLLES and DUBOIS, 1996).

- Les produits toxiques ou inhibiteurs. Les produits inhibiteurs de l'activité métabolique de *S. cerevisiae* mis en cause sont l'éthanol issu du métabolisme (NOVAK *et al.*, 1981), les acides gras à moyenne chaîne de la série acétique (ALEXANDRE and CHARPENTIER, 1998 ; BISSON, 1999 ; RIBEREAU-GAYON, 1999 ; RASMUSSEN *et al.*, 1995). Dans ce groupe, il faut aussi mentionner les éventuels résidus de produits phytosanitaires issus du traitement tardif de la vigne qui peuvent entraîner des ralentissements voire des arrêts de la fermentation alcoolique (CABRAS *et al.*, 1999).

- Les facteurs inhérents à la conduite de la vinification. Les intrants technologiques ou les opérations de procédé peuvent être à l'origine de problèmes de fermentation (ALEXANDRE and CHARPENTIER, 1998 ; BISSON, 1999 ; RIBEREAU-GAYON, 1999). Par exemple, l'addition d'une quantité insuffisante de SO₂ n'empêcherait pas le développement de la flore bactérienne indigène qui pourrait alors modifier le profil de croissance de *S. cerevisiae* (HUANG *et al.*, 1996). Mais à l'opposé, une trop forte concentration de SO₂ peut inhiber la croissance de levures. Il est également reconnu qu'une clarification excessive du moût en dessous de 100 NTU peut rendre la fermentation difficile et parfois induire un arrêt de fermentation. Enfin, il ne

faut pas négliger les causes inhérentes à l'erreur humaine par exemple la présence de produits toxiques (désinfectant, détergent) ou une mauvaise maîtrise de la température de fermentation.

L'impact économique de ce type d'accident a fait l'objet d'une étude récente par DeSANTÉ (1996) en prenant comme exemple la région vinicole de la Napa Valley pour le cépage Chardonnay. Pour cet auteur, les arrêts de fermentation induisent une augmentation des frais de vinification et une perte de qualité du produit obtenu. Le manque à gagner est évalué à 70% de la valeur attendue.

Quelle que soit la cause de l'arrêt (ou du ralentissement excessif de l'activité fermentaire), le traitement le plus fréquemment utilisé pour relancer la fermentation alcoolique est l'addition d'un inoculum actif de levures, communément appelé pied de cuve, avec parfois une ou deux phases d'acclimatation de la population de levures aux conditions du vin en arrêt de fermentation. Cette inoculation est parfois précédée d'une détoxification du milieu par un traitement avec des écorces de levures (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1984) ou accompagnée de l'addition d'éléments nutritifs. Il a aussi été montré que dans ces cas de réensemencement on peut avoir intérêt à utiliser une souche de levure différente de celle initialement inoculée (STREHAIANO *et al.*, 1985). Il est également courant de mettre en œuvre des techniques de prévention et de ce point de vue le contrôle de l'apport azoté et de celui de l'oxygène lors de la phase de croissance active est connu pour donner de bons résultats. Toutefois, dans certains cas, les protocoles curatifs ne sont pas efficaces. L'utilisation de microorganismes inclus, déjà réalisée au laboratoire pour d'autres applications pouvait apporter une solution élégante au traitement des arrêts en raison du contrôle aisé de l'activité des microorganismes qu'elle permet : maîtrise des quantités, maîtrise du temps d'action, possibilité de réutilisation.

Dans ce travail, un protocole alternatif pour le traitement des arrêts de fermentation, utilisant des levures incluses dans des gels d'alginate de calcium dans des conditions réelles de vinification est présenté.

MATÉRIEL ET METHODES

I - SOUCHE DE LEVURES.

Une levure sèche active (LSA) de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* souche bayanus EC1118 produite et commercialisée par la société Lallemand (Montréal, Canada) a été utilisée. Cette levure a été choisie pour sa capacité fermentaire à de fortes concentrations en éthanol.

II - PRODUCTION DE LEVURES INCLUSES

Dans un premier temps, la LSA a été réhydratée dans une solution aqueuse selon le protocole recommandé par la société Lallemand. Puis, les cellules de *S. cerevisiae* ont été encapsulées dans un gel d'alginate de calcium (*S. cerevisiae*-IGAC) selon le protocole développé par la société Proenol (V. N. Gaia, Portugal) et le Laboratoire de Génie Chimique UMR-CNRS 5503 (Toulouse, France). Les billes obtenues (communément appelées ainsi à cause de leur forme sphérique) sont alors partiellement déshydratées dans une colonne de séchage en lit fluidisé. Les billes sont conservées dans un emballage de 1 kilogramme avec atmosphère modifiée à 4 °C jusqu'au moment de leur utilisation.

III - SUIVI DE FERMENTATION

Des échantillons de 50 mL ont été prélevés régulièrement dans la cuve de fermentation. Avant prélèvement, et afin d'éviter le risque d'hétérogénéité lié au gradient de concentration, le milieu est homogénéisé par un brassage mécanique ou à l'azote. La concentration totale des levures a été déterminée par comptage direct des cellules au microscope (Olympus BH-2 avec un grossissement 40x10). La numération est effectuée à l'aide d'un hématimètre de Thoma. La viabilité représentant le nombre de cellules vivantes par rapport à la population totale est estimée par comptage au microscope, sur cellule de Thoma, après coloration au bleu de méthylène (POSTGATE, 1969). Le volume restant a été centrifugé à 11 000 tours par minute pendant 10 minutes. Le surnageant est conservé à -20 °C pour le dosage ultérieur des produits et des substrats. La concentration résiduelle des sucres réducteurs (glucose et fructose), de l'acide L-malique et de l'acide acétique ont été mesurés par dosage enzymatique en utilisant les kits commerciaux correspondants Boehringer Biochemia (Mannheim, Allemagne). L'acidité totale, l'acidité volatile et le pH ont été mesurés d'après la méthode officielle (Reg. CEE 2676/90). Le SO₂ libre et le SO₂ total ont été déterminés par iodométrie. La concentration d'azote assimilable a été déterminée par titration au formol.

IV - TRAITEMENT DES DONNÉES.

Pour calculer les valeurs de la vitesse de consommation des sucres (V_S), tout d'abord un lissage polynomial du profil des sucres résiduels (S) en fonction du temps (t) a été effectué à l'aide d'un logiciel (Macro

$$V_S = - \left[\frac{S(t + \Delta t) - S(t)}{\Delta t} \right]$$

Lissage Excel). Enfin, les valeurs de V_S ont été calculées par l'équation suivante :

V - PROTOCOLE D'UTILISATION DES LEVURES INCLUSES

1) Support d'utilisation.

Initialement, les billes de *S. cerevisiae*-IGAC ont été introduites dans des sacs de Nylon. Ce tissu a une porosité de 0,5 millimètre permettant une libre diffusion du vin et du gaz carbonique, mais empêchant la sortie des billes car celles-ci ont un diamètre moyen de 2 mm. Trois kilogrammes de billes sont introduits dans chaque sac. La dose mise en œuvre est de 75 grammes par hectolitre de vin ce qui est équivalent à une concentration de 5 millions de levures viables par millilitre de vin. Les billes occupent un tiers du volume total du sac. Les sacs sont maintenus immergés par un lest attaché à leur partie inférieure.

2) Réhydratation et acclimatation.

Dans un premier temps, afin de réhydrater la levure *S. cerevisiae*-IGAC, 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 de *S. cerevisiae*-IGAC, 5 litres de solution de réhydratation 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.

3) Introduction dans la cuve de fermentation.

Tout d'abord, les sacs sont égouttés pour éliminer l'excédent de solution de réactivation. Ensuite, les sacs sont introduits dans la cuve en arrêt de fermentation alcoolique. Il est important que les sacs soient immergés complètement dans le vin présentant l'arrêt de fermentation. Les sacs sont fixés à la partie supérieure de la cuve à l'aide d'une corde et peuvent ainsi être facilement retirés de la cuve à la fin du traitement.

RÉSULTATS

I - TRAITEMENT DES ARRÊTS DE FERMENTATION EN MICROVINIFICATION.

Initialement, le pouvoir fermentaire des levures incluses a été testé dans un vin présentant un arrêt de la fermentation alcoolique. Le vin a été prélevé sur une cuve de 6 000 litres d'un vin rouge de Tannat en arrêt de fermentation. Sur l'essai les billes ont été mises en œuvre suivant le protocole décrit ci-dessus. En parallèle une autre micro vinification a été effectuée en

employant le protocole traditionnel pour la reprise d'un arrêt de fermentation (ITV France, 1999). Les fermentations ont été effectuées dans un volume d'un litre. La température de fermentation a été maintenue à 25 °C. Dans les deux protocoles, les Enlarmes contenant le vin ont été agités quotidiennement pendant 10 secondes. Les résultats obtenus sont portés dans la figure 1.

On peut observer que l'apport des levures incluses (*S. cerevisiae*-IGAC) induit une reprise rapide de la consommation des sucres. La vitesse de consommation de sucres présente une valeur maximale de 3,4 grammes par litre et par jour pendant les 2 premiers jours de traitement. Par la suite, cette vitesse diminue progressivement et la concentration souhaitée de moins d'un gramme par litre de sucres réducteurs est atteinte après une semaine de traitement. Une observation microscopique montre que les levures ne quittent pas la matrice d'inclusion. Cet accident (relargage) est évité grâce au protocole d'inclusion mis au point.

Sur le témoin, on observe après avoir ajouté l'inoculum actif de levures libres (5 millions de cellules par millilitre), suivant le protocole préconisé par l'ITV France (ITV, 1999) et schématisé dans le tableau I, une légère augmentation dans la concentration en sucres réducteurs. Ceci peut être expliqué par les sucres résiduels du pied de cuve. Plus tard, une faible consommation des sucres a été détectée, sans que toutefois, la vitesse de consommation ne dépasse la valeur de 0,30 gramme de sucres consommé par jour, soit une vitesse 10 fois inférieure à celle observée pour les levures encapsulées. Après cinq jours de traitement, plus aucune diminution réellement significative de la concentration en sucres n'est observée et la fermentation se retrouve de nouveau en situation d'arrêt avec une teneur en sucres de 9 grammes par litre. Un contrôle de la population de levures montre qu'il n'y a pas eu

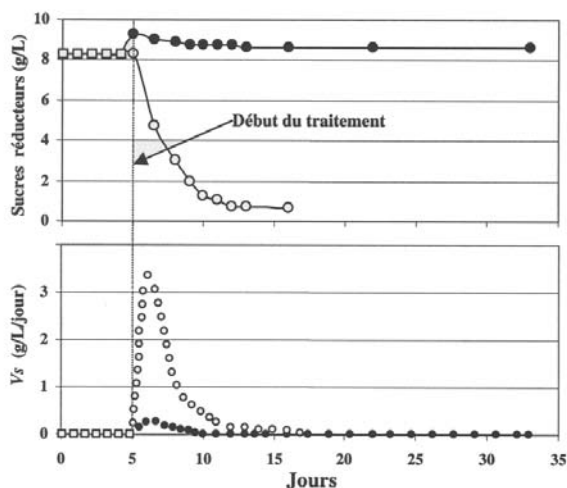


Fig. 1 - Evolution de la concentration des sucres résiduels au cours du traitement d'un arrêt de fermentation en rouge.

Avant traitement (o), traitement avec *S. cerevisiae* incluse (m), traitement avec protocole traditionnel (l).

Evolution of residual sugars concentration during the treatment of a stuck fermentation of red vinification.

Before treatment (o), with encapsulated *S. cerevisiae* yeast (m) and traditional procedure (l).

de multiplication significative et que la mortalité est proche, à ce stade, de 100 %.

Pour ce cas spécifique, le protocole traditionnel ne s'est pas avéré adapté.

Le tableau II montre les caractéristiques initiales et finales du vin avant et après le traitement de l'arrêt en utilisant les cellules incluses de *S. cerevisiae*. L'augmentation de la concentration d'alcool est proportionnelle à la quantité de sucres consommés et le rendement de 0,45 grammes d'éthanol produit par gramme de sucre consommé est identique à celui obtenu en vinification. L'acidité volatile n'a pas varié ce qui montre d'une part

Tableau I. Schéma du protocole ITV de traitement des arrêts de fermentation pour 100 hL du vin.

ITV's procedure for stuck fermentation treatment to 100 hL of wine.

Etapas	Opérations	Températures	Durée
Réactivation	LSA (100 g) Eau(47 l) Saccharose (5 kg) Phosphate d'ammonium (200 g) Agitation permanent douce	Début : 37 °C Fin : 20 °C	18 à 24 h.
Préparation du levain	Solution ci dessus (50 l) Vin en arrêt (210 l) Saccharose (20 kg) Eau (30 l) Agitation permanente douce	20 °C	3 jours
Levurage	Levain : 3 hl pour 100 hl de vin en arrêt	15 à 20 °C	

**Tableau II - Caractéristiques
d'une micro-vinification en rouge avant
et après traitement d'arrêt de fermentation
par *S. cerevisiae* incluse.**

**Characteristics of a red micro-vinification before and
after treatment of stuck fermentation by encapsulated
S. cerevisiae yeast.**

	Début du traitement	Fin du traitement
Éthanol (% v/v)	14,5	14,9
Sucres réducteurs (g/L)	8,31	0,66
Acidité volatile (g/L)	0,43	0,44
Acidité totale (g/L)	6,5	6,5
pH	3,35	3,34
SO ₂ total (mg/L)	26	ND
SO ₂ libre (mg/L)	0	ND
Acide L-malique (g/L)	3,0	3,0
Azote assimilable (mg/L)	111	ND

qu'il n'y a pas eu de déviation de la voie métabolique d'utilisation des sucres et d' autre part que l'utilisation de ces levures incluses ne favorise pas le développement de bactéries lactiques ou acétiques. L'absence de développement de bactéries lactiques est confirmé par le maintien d'une concentration constante d'acide malique entre le début et à la fin du traitement. Pour cet exemple, la valeur de l'azote assimilable montre que le vin en arrêt de fermentation était suffisamment riche en azote (111 mg/L) pour permettre à la population de levure d'utiliser les 8,3 g/L de sucre présents au moment de l'arrêt.

En ce qui concerne la résistance et l'acclimatation, nous avons observé que lorsque la même souche de

levure se trouve immobilisée dans des gels d'alginate de sodium, elle présente une meilleure tolérance et une meilleure adaptation aux conditions du vin que les cellules libres. En ce qui concerne les molécules toxiques, bien que nous ne l'ayons pas encore prouvé, il est probable que l'alginate de calcium diminue le contact direct entre certaines de ces molécules et la paroi de la levure atténuant ainsi leur toxicité.

TRAITEMENT DES ARRÊTS DE FERMENTATION EN CONDITIONS RÉELLES DE VINIFICATION.

Les billes de *S. cerevisiae*-IGAC ont été testées dans plusieurs cuves de vinification en rouge et en blanc mais aussi dans des fermentations en barriques (méthode bourguignonne) en situation d'arrêt de fermentation alcoolique.

Les volumes traités allaient de 1 à 325 hL. Les essais ont été réalisés dans les environnements réels de vinification : chaque traitement a été effectué dans les caves concernées, dans des conditions non stériles, et en utilisant l'eau potable de la cave pour préparer la solution de réactivation et bien évidemment avec le matériel de la cave comme système de contrôle de température (une simple canne chauffante et dans certains cas contrôle automatique), remontage, etc. Le tableau III résume une partie des arrêts de fermentation traités pour les millésimes de 1999, 2000 et 2001. Dans ce tableau figure aussi l'exemple d'un arrêt de fermentation en vinification en blanc moelleux : il est bien évident que dans ce cas particulier, seulement une réduction partielle de sucres est souhaitée. Ainsi lorsque la concentration atteint la valeur voulue par l'œnologue, les

Tableau III - Exemples de traitement des arrêts de fermentation

Some examples of stuck fermentation treatment

Appellation ou Pays	Volume (L)	Vinification	Sucres début	Sucres fin	Temp. moyenne (°C)	SO ₂ Libre (mg/L)
Gaillac	6000	Rouge	15,4	1,4	18	11
Gaillac	500	Rouge	19,3	2,2	20	11
Gaillac	500	Rouge	17,0	1,8	20	11
Gaillac	2600	Blanc	14,0	0,2	18	10
Gaillac	6000	Blanc	10,35	3,2	19	20
Gaillac	Barriques 250 L	Blanc	19,8	2,5	17	12
Gaillac	Barriques 450 L	Blanc	22,7	1,2	17	13
Gascogne	100	Blanc	34,6	1,2	18	15
Gascogne	6000	Moelleux	82	62	18	0
Madiran	6000	Rouge	9,8	0,43	22	10
Madiran	6000	Rouge	4,9	3,0	22	12
Portugal	3500	Rouge	32	< 0,5	15	8
Portugal	10000	Rouge	9	< 0,5	22	10
Portugal	32500	Rouge	10,5	< 0,5	21	10

levures sont enlevées de la cuve de fermentation. Ce simple geste est suffisant pour arrêter l'évolution des sucres dans la cuve puisque les levures activées se trouvent dans les billes d'alginate de sodium.

A titre d'exemple, la figure 2 montre l'évolution de sucres réducteurs après l'incorporation de cellules actives de *S. cerevisiae*-IGAC 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. Les levures de *S. cerevisiae*-IGAC ont été utilisées suivant le protocole décrit précédemment. 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*-IGAC 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 concentration de sucres réducteurs mesurée à la fin du traitement est inférieure à 0,5 g/L.

Les principales caractéristiques du vin avant et après le traitement sont résumées dans le tableau IV. L'acidité volatile, la variable la plus importante à surveiller pendant un traitement d'arrêt de fermentation, est restée constante. Dans le traitement des cas présentés ici, une dégustation a été effectuée : aucun défaut organolep-

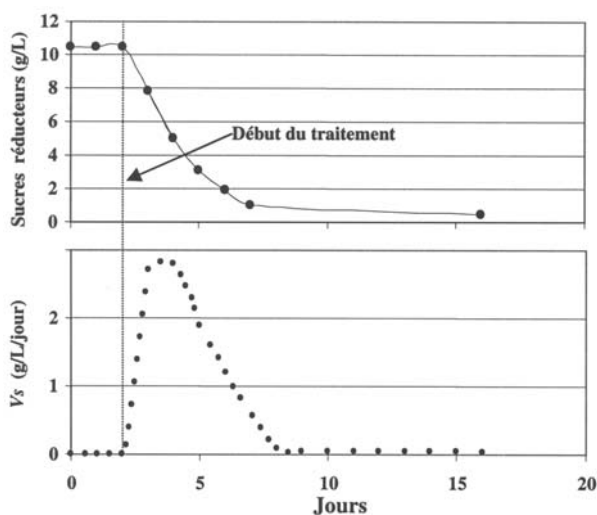


Fig. 2. Evolution de la concentration des sucres résiduels et profil de leur vitesse de consommation au cours du traitement d'un arrêt de fermentation en rouge avec utilisation de *S. cerevisiae* incluse.

Evolution of residual sugars concentration, temperature and sugar consumption rate during the treatment of a stuck fermentation (red vinification) with encapsulated *S. cerevisiae* yeast.

tique à la fin de la fermentation alcoolique n'a été mis en évidence.

DISCUSSION-CONCLUSION

Bien que les fermentations languissantes et les arrêts de fermentations aient toujours existé en vinification en blanc et en rouge (RIBEREAU-GAYON, 1999), il est difficile de trouver des données statistiques sur leur fréquence, toutefois, on parle d'une moyenne autour de 5 %, ce taux variant selon les millésimes et les types de vin. Des rapports mentionnent que pour le cas de la vinification en blanc les arrêts de fermentation sont de plus en plus fréquents. Cette observation peut s'expliquer principalement par les progrès technologiques concernant le débouillage et la clarification du moût de raisin. Il est certain que les moûts clarifiés acquièrent un meilleur potentiel pour l'expression des arômes, mais en contrepartie, la levure peut y rencontrer des carences nutritives néfastes au bon terme de la fermentation alcoolique. Quelles que soient les causes probables de l'arrêt de fermentation, dans la plupart des cas, le protocole adopté par l'œnologue pour son redémarrage peut être résumé de la manière suivante :

- Premièrement, l'addition dans des concentrations bien établies de composés autorisés en œnologie dans la cuve de fermentation (écorces de levures, sels minéraux, activateurs de fermentation, source azotée parmi d'autres).

- Deuxièmement, contrôle et suivi de certains paramètres externes comme, par exemple, l'oxygénation (par remontage ou aération directe bien contrôlée) ou la température.

Tableau IV - Caractéristiques d'une vinification en rouge avant et après traitement d'arrêt de fermentation par *S. cerevisiae* incluse.

Characteristics of a red vinification before and after treatment of stuck fermentation by encapsulated *S. cerevisiae* yeast.

	Début du traitement	Fin du traitement
Éthanol (% v/v)	13,6	14,2
Sucres réducteurs (g/L)	10,5	< 0,5
Acidité volatile (g/L)	0,26	0,26
pH	3,83	3,83
SO ₂ total (mg/L)	26	ND
SO ₂ libre (mg/L)	10	ND
Acide L-malique (g/L)	2,3	2,3
Azote assimilable (mg/L)	143	ND

- Finalement, introduction d'un pied de cuve contenant une population de levures actives parfois préalablement acclimatées au milieu alcoolique.

Ce protocole n'est pas toujours efficace. Ainsi, il peut arriver qu'aucune reprise d'activité fermentaire ne se manifeste ou que cette reprise ne dure pas : la cuve se trouve une fois de plus en arrêt de fermentation comme nous l'avons montré dans le premier essai rapporté.

Dans ce travail, nous avons présenté un protocole relativement simple pour le traitement d'arrêts de la fermentation. Il consiste en l'utilisation de levures incluses de *S. cerevisiae*-IGAC. L'utilisation de levures incluses a été proposée depuis quelques années pour la production de vins effervescents et pour la démalication du moût de raisin (MAGYAR and PANYIK, 1989 ; YOKOTSUKA, *et al.*, 1997). Cependant cette technique n'a pas connu de développement industriel notable en raison de l'absence de procédé industriel fiable de fabrication des billes (problème de relargage de levures notamment pour l'utilisation en prise de mousse). Dans le cas du traitement d'un arrêt de fermentation, un des avantages de l'utilisation de levures de *S. cerevisiae*-IGAC est la simplicité des phases de réhydratation et d'acclimatation qui se font hors de la cuve à traiter ce qui permet le contact direct de la population avec les substances nutritives notamment des sels de phosphate d'ammonium. MONTEIRO et BISSON (1991), ont rapporté le risque d'ajouter ce sel directement au moût de raisin car il peut favoriser la production d'urée, précurseur de l'éthyl carbamate.

L'utilisation dans les conditions réelles de vinification de *S. cerevisiae*-IGAC est une opération relativement simple car elle peut être réalisée par une seule personne ; la préparation ne prend que quelques minutes. Ensuite 8 heures d'attente sont nécessaires avant l'introduction des levures dans la cuve de fermentation. Le protocole présenté a montré une grande efficacité (voir tableau III). La vitesse de consommation des sucres a été de l'ordre de 3 g/L/jour à 20 °C. Il est important de signaler que dans tous les cas présentés ici, les billes de *S. cerevisiae*-IGAC ont été mises en œuvre après que le protocole classique (Tableau I) testé au préalable ait échoué. Bien entendu, cette formulation de *S. cerevisiae*-IGAC ne peut remédier aux arrêts de fermentation provoqués par une erreur humaine, par exemple en cas de présence de produits toxiques (détergent, insecticide...) ou de SO₂ à des concentrations supérieures à celles tolérées par la levure.

Les arrêts de fermentations ne sont pas un problème qui concerne uniquement l'œnologie. Ainsi en brasserie, les fermentations languissantes et les arrêts de fermentations sont fréquemment rapportés (FIX, 1993),

l'utilisation de levures immobilisées pourrait aussi y être envisageable.

Remerciements : Les auteurs remercient vivement les caves portugaises et françaises qui ont accepté de participer à cette expérimentation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALEXANDRE H. and CHARPENTIER C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, **20**, 20-27.
- BATAILLON M., RICO A., SABLAYROLLES J.M., SALMON J.M. and BARRE P., 1996. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions : impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 145-150.
- BISSON L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**, 107-119.
- CABRAS P., ANGIONI A., GARAU V.L., PIRISI F. M., FARRIS G.A., MAGAU G. and EMONTI G., 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3854-3857.
- DELIA-DUPUY M.L. and STREHAIANO P., 1996. La fermentation alcoolique en vinification : observations cinétiques et physiologie. *Rev. Fr. Œnol.*, **159**, 19-23.
- DeSANTE., 1996. A new idea for detecting and preventing stuck fermentations. Rapport de L'american vineyard. Viticulture and Enology laboratory. Editor : Dr. Christian E. Butzke. Davis California.
- FIX G.J., 1993. Diacetyl : Formation, Reduction, and Control. *Brewing Techniques*, **2**, 20-25.
- HUANG Y.C., EDWARDS C.G., PETERSON J.C. and HAAG K.M., 1996. Relationship between sluggish fermentation and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**, 1-10.
- INGLEDEW W.M. and KUNKEE R.E., 1985. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 65-76.
- ITV France, 1999. *Arrêts de fermentation alcoolique*. 12-13. Manuel de diffusion de ITV France.
- JULIEN A., ROUSTAN J.L., DULAU L. and SABLAYROLLES J.M., 2000. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts : Technological consequences. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**, 215-222.
- KUDO M., VAGNOLI P. and BISSON L.F., 1998. Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**, 295-301.
- LAFON-LAFORCADE S., GENEIX C. and RIBEREAU-GAYON P., 1984. Les modalités de mise en œuvre des écorces de levures en vinification. *Connaissance Vigne Vin*, **2**, 111-125.
- MAGYAR I. and PANYIK I., 1989. Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Calcium alginate gel. *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 233-240.
- MONTEIRO F.F. and BISSON L.F., 1991. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 47-57.

- NOVAK M., STREHAIANO P., MORENO M. and GOMA G., 1981. Alcoholic fermentation : on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 201-11.
- POSTGATE J.R. 1969. *Methods in Microbiology*. Norris. J. R. and Ribbons D. W. Academic Press, New York.
- RASMUSSEN J.E., SCHULTZ E., SNYDER R.E., JONES R.S. and SMITH C.R., 1995. Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 278-280.
- RIBÉREAU-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.
- SABLAYROLLES J.M. and DUBOIS. C., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferm. Bioeng.*, **82**, 377-381.
- STREHAIANO P., MOTA M. and GOMA G., 1985. Inhibitions non conventionnelles des croissances levuriennes. *Connaissance Vigne Vin*, **19**, 97-107.

Manuscrit reçu le 30 juin 2002 ; accepté pour publication le 10 septembre 2002

Arrêts de fermentation

VAN VUUREN H.J.J. and DICKS L.M., 1993. *Leuconostoc*

oenos : A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 99-112.

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.