

# LES LEVURES IMMOBILISÉES :

## UNE RÉALITÉ OENOLOGIQUE

P. STREHAIANO<sup>(1)</sup>, F. CENTENO<sup>(2)</sup>,

<sup>(1)</sup> LABORATOIRE DE GÉNIE CHIMIQUE, UMR INP/CNRS 5503, 5 RUE PAULIN TALABOT, 31106 TOULOUSE CEDEX, BP 1301, FRANCE

<sup>(2)</sup> PROENOL LDA, CANELAS. V.N. DE GAIA, PORTUGAL

### Introduction

Dès les années 1960 l'idée de fixer les « catalyseurs biologiques » c'est-à-dire les enzymes d'abord, puis les micro-organismes a assez rapidement débouché sur des applications industrielles comme les électrodes à enzymes fixées, les bactéries adsorbées en vinaigrerie, ou encore les lits bactériens en dépollution. En œnologie, même si les études en laboratoires sont nombreuses et déjà anciennes puisque déjà le Dictionnaire du Vin les mentionne en 1998, à ce jour cependant, les réalisations pratiques sont encore limitées.

### 1. Pourquoi immobiliser les micro-organismes ?

Au plan de la théorie, on attend de l'immobilisation des cellules microbiennes les avantages suivants :

- accroître la vitesse de réaction en augmentant le nombre de cellules présentes dans le réacteur.
- éviter la perte du micro-organisme en fin de réaction et donc avoir la possibilité de le réutiliser.
- faciliter la séparation cellules/liquide, ce qui permet soit de mettre fin à la réaction au temps voulu soit de faciliter les opérations de clarification en fin de réaction.

A ce jour, les applications en œnologie visent essentiellement ce dernier objectif.

### 2. Comment immobiliser les micro-organismes ?

Les procédés utilisés consistent à fixer les cellules sur un support (adsorption), à les inclure dans une matrice (inclusion), ou à les confiner dans une partie du réacteur (confinement).

L'adsorption est le procédé le plus anciennement étudié : les cellules adhèrent à un support inerte par le biais d'interactions électrostatiques. Les supports mis en œuvre sont de nature très diverse : bois, céramique, pouzzolane, bentonite... En œnologie, une équipe grecque propose depuis longtemps l'emploi de matériaux tels que fragments de pellicule de raisins ou de divers fruits (pomme par exemple). Ces études de laboratoire présentent des résultats intéressants mais à ce jour il n'y a pas de développement industriel.

L'inclusion consiste à incorporer les cellules microbiennes dans la matrice d'un polymère plus ou moins rigide, synthétique (polyacrylamide par exemple) ou naturel (protéine comme la gélatine ou polysaccharide comme la cellulose, l'agar-agar ou les alginates). C'est à ce jour la seule technique qui ait un réel développement industriel.

Le confinement vise à confiner les micro-organismes, dont la concentration peut être très élevée, dans une partie du réacteur grâce à une barrière physique comme une membrane de microfiltration ou une fibre creuse. Ce procédé a été testé avec succès en œnologie, pour l'élaboration des vins effervescents, mais pour des raisons de coût a été vite abandonné.

Enfin, bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler d'une immobilisation, on peut rapprocher de ces techniques celle de la floculation. Ici les cellules microbiennes se lient entre elles par des ponts ioniques établis

entre des sites des parois cellulaires et les cations présents dans le milieu. Dans certains cas, en particulier chez les levures, il peut se former de véritables ponts mycéliens entre les cellules. En vinification, des levures agglomérantes sont déjà utilisées pour la prise de mousse des vins effervescents en vue de faciliter le dégorgement.

### 3- Les applications actuelles en œnologie

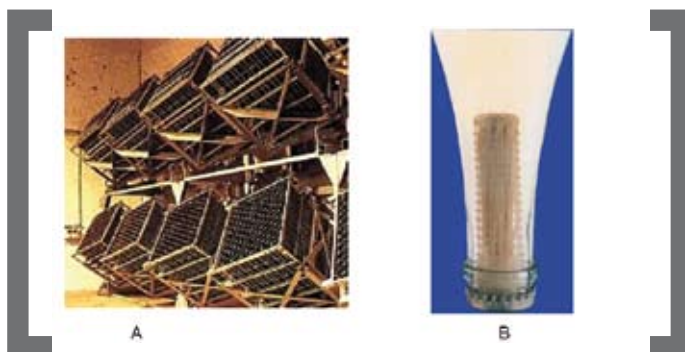
L'emploi de micro-organismes immobilisés est possible pour résoudre les problèmes très spécifiques liés à la prise de mousse des vins effervescents, à la maîtrise de l'acidité et aux arrêts de fermentation. D'autres applications sont actuellement à l'étude.

#### 3.1 Prise de mousse

Dans l'élaboration des vins effervescents en méthode traditionnelle l'opération du remuage qui vise à éliminer les levures en fin de fermentation est une étape coûteuse, encore effectuée manuellement dans beaucoup de cas. Le remuage mécanique est un procédé efficace et opérationnel mais qui nécessite un lourd investissement. La mise en œuvre de cellules de levures immobilisées est une alternative élégante qui a, dès les années 1970, intéressé les chercheurs. Deux approches étaient poursuivies.

- Levures confinées dans une cartouche : le système « Millispark ».

L'objectif du système est à la fois de supprimer le remuage et d'éviter la congélation du col pour éliminer les cellules de levure. Les cellules de levure sont retenues à l'intérieur d'un petit cylindre par le biais d'une membrane microporeuse. Ce cylindre est placé dans le col de la bouteille. Les échanges entre les levures et le milieu se font librement à travers cette membrane. Lorsque la fermentation est terminée il suffit de retirer le cylindre et on obtient ainsi un vin limpide. Par la suite la membrane a été remplacée par un réseau de fibres creuses (figure 1). Les essais réalisés à l'échelle industrielle ont montré que ce procédé donnait d'excellents résultats (Lemonnier et Duteurtre, 1989). Cependant son coût trop élevé par rapport à celui du remuage manuel ou mécanique a rapidement conduit à son abandon.



Figures 1: A dispositif de remuage mécanique ; B photographie d'une cartouche « Millispark » avec fibres creuses

- Levures immobilisées en gel d'alginate

Il s'agit ici d'emprisonner les cellules dans un gel d'alginate, polymère

naturel, non toxique et autorisé. Les premiers essais ont vite montré que pour éviter toute sortie des cellules hors de la matrice et donc leur prolifération dans le vin, il convenait d'enrober le noyau « cellules-alginate » d'une couche externe d'alginate stérile. Le produit obtenu est communément appelé « billes double-couche » (figure 2). Depuis les premiers essais, le procédé de production de telles « billes » a été industrialisé et plusieurs sociétés proposent de tels produits, d'une qualité pas toujours comparable. Par exemple, Proenol Lda avec qui nous développons ce procédé depuis 1992, propose des billes sèches, comparables aux LSA, dont l'efficacité et la durée de conservation sont garanties. La mise en œuvre est aujourd'hui parfaitement maîtrisée, y compris l'introduction des billes dans la bouteille au moment du tirage. Les essais réalisés ont largement démontré que la qualité du produit obtenu était en tous points comparable à celle de vins élaborés par remuage. L'avantage de cette technique est de ne nécessiter ni main d'œuvre spécialisée ni investissement en matériel ou locaux et donc de permettre au producteur de s'adapter rapidement aux besoins du marché. A ce jour on peut estimer à près de 10 millions le nombre de bouteilles élaborées par ce procédé, tant dans les appellations « méthode traditionnelle » y compris Champagne, que dans les méthodes « artisanales », comme la blanquette de Limoux par exemple. Bien sur, l'emploi de ces billes impose que le vin soit parfaitement stable vis-à-vis de tout développement microbien comme des risques de précipitations, tartriques par exemple.

touchent :

- à l'immobilisation de bactéries lactiques afin de réaliser la FML.
- à l'immobilisation de levures non-*Saccharomyces* en vue de parfaire la maîtrise aromatique des vins.
- à la mise en œuvre de réacteurs continus à cellules immobilisées tant pour la FA que la FML ou la FMA.

### 5. Situation par rapport à la législation

A ce jour, en France, la seule application explicitement autorisée concerne la prise de mousse des vins effervescents. Alors que la mise en œuvre de cellules « libres » de *Schizosaccharomyces* est autorisée, leur emploi sous forme immobilisée ne l'est pas !!! Il en est de même en ce qui concerne l'utilisation de cellules immobilisées pour le traitement des arrêts de fermentation !!! Mais tous les pays ne sont pas aussi illogiques.

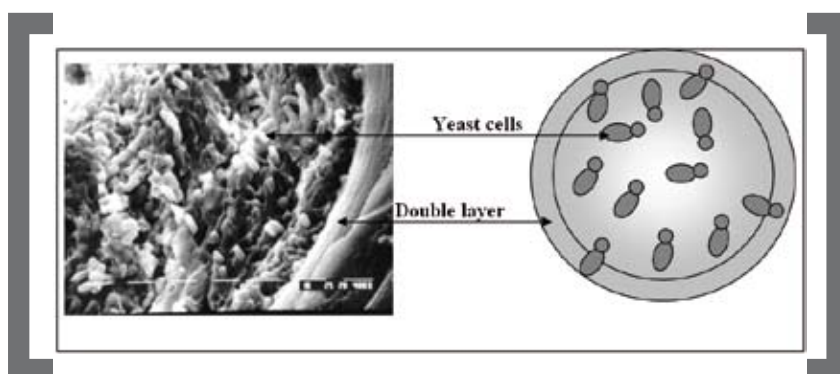
### Références

LEMONNIER J., DUTEURTRE B.  
Un progrès important pour le Champagne et les vins de "méthode traditionnelle".  
Revue Française d'Oenologie, 1989, 121, 15-26.

Nos travaux sur ce sujet

TAILLANDIER P., RIBA J.P., STREHAIANO P.  
Malate degradation by *Schizosaccharomyces* yeasts included in alginate beads.  
Bioprocess Engineering, 1991, 7, 141-144.

TAILLANDIER P., CAZOTTES M.L., STREHAIANO P.  
Deacidification of grape must by *Schizosaccharomyces* entrapped in alginate beads : a continuous fluidized bed process.  
The (Bio) Chemical Engineering Journal, 1994, 55, 29-33.



Figures 2: A droite : schéma de principe d'une bille double-couche.  
A gauche : coupe au microscope électronique

### 3.2 Maîtrise de l'acidité

Le procédé courant de dégradation de l'acide malique est la bien connue Fermentation Malo-Lactique (FML) due à *Oenococcus oeni*. Même si des progrès réels ont été réalisés dans la production de levains bactériens, la réussite n'est pas toujours assurée, tout spécialement lorsque les vins très acides ou carencés ne permettent pas le développement des bactéries. L'emploi de levures du genre *Schizosaccharomyces* qui réalisent la Fermentation Malo Alcoolique (FMA) a été envisagé dès les années 1970. Le moût estensemencé en *Schizosaccharomyces* avant la FA et lorsque le pH a atteint la valeur souhaitée, un apport massif de levures *Saccharomyces* est effectué, ceci afin d'éviter un trop fort développement de *Schizosaccharomyces* susceptible de conduire à de faux arômes. L'immobilisation de ces levures permet de maîtriser totalement leur activité : les billes contenant ces *Schizosaccharomyces* sont placées dans une sorte de sac poreux, lui même introduit dans la cuve à traiter (figure 3). Lorsque le pH a atteint la valeur attendue le sac est retiré de la cuve et le moût estensemencé avec *Saccharomyces*. Les mêmes « billes » peuvent d'ailleurs être réutilisées plusieurs fois. Les très nombreux tests réalisés depuis des années ont montré la fiabilité du procédé.

### 3.3 Traitement des arrêts de fermentation

La reprise de fermentation d'un moût arrêté est souvent difficile à réaliser et les protocoles efficaces sont toujours lourds, impliquant la détoxification du moût et des étapes successives de préparation du levain. L'emploi de levures *Saccharomyces* incluses permet d'apporter facilement une population très importante. De plus, dans le protocole de leur production, ces levures sont abondamment pourvues en facteurs nutritionnels, ce qui leur assure une très bonne activité y compris dans des cas difficiles.

### 4. Perspectives de développement

Dans la bibliographie, il ressort que les utilisations à l'étude actuellement



Figure 3 : utilisation de levures *schizosaccharomyces*

SILVA M. de F., SANTOS L., SILVA S., STREHAIANO P.  
Producao industrial de leveduras encapsuladas para inoculacao directa-  
Proelif, e sua aplicacao na producao de vinhos espumantes.  
Enologia, 1998, 31/32, 23-26.

SILVA S., RAMON PORTUGAL F., SILVA P., ABREU S., TEIXEIRA DA  
SILVA M. , STREHAIANO P.

"Démalication de moûts blancs et rouges par des levures *Schizosaccha-*  
*romyces pombe* incluses dans des billes d'alginate sèches"  
Revue Française d'Oenologie, 2002, 196, 18-22.

SILVA S., RAMON PORTUGAL F., SILVA P., TEIXEIRA DA SILVA M. ,  
STREHAIANO P.

"Vinification de vin moelleux en utilisant des levures incluses"  
Revue des Œnologues, 2002, 104, 23-26.

SILVA S., RAMON PORTUGAL F., SILVA P., TEIXEIRA DA SILVA M. ,  
STREHAIANO P.

Use of encapsulated yeast for the treatment of stuck and sluggish fer-  
mentations.

Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2002, 3, 161-  
168.

SILVA S., RAMON PORTUGAL F., SILVA P., ABREU S., TEIXEIRA DA  
SILVA M. , STREHAIANO P.

"Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomy-*  
*ces pombe*"

American Journal of Enology and Viticulture, 2003, 54, 50-55.