

MAXAFERM®

Vers une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique par addition au moût d'un bio-régulateur spécifique :
Impact sur la vitesse de fermentation et sur les caractéristiques du vin.

Les fermentations languissantes et les arrêts constituent un problème majeur pour les vinificateurs en raison de leur caractère faiblement prévisible. Ils se produisent avec une plus forte probabilité avec les moûts pauvres en azote assimilable, ayant une forte concentration en sucre, ou issus de variétés telles que le Chardonnay. Certaines parcelles viticoles sont identifiées comme conduisant à des problèmes fréquents sans que la cause des difficultés de fermentation en soit toujours bien identifiée.

Dans tous les cas, les difficultés de fermentation sont dues à une diminution progressive de la viabilité des levures, qui est la conséquence de l'effet combiné de divers facteurs : la perte de perméabilité de la membrane cytoplasmique de la levure à cause d'une synthèse de stérols insuffisante, l'adsorption d'acides gras toxiques, une augmentation de la concentration en alcool éthylique, une diminution de la quantité d'azote assimilable ou une forte concentration en CO₂.

La multiplicité de ces causes a deux conséquences : d'une part, elle confère un caractère difficilement prévisible aux difficultés de fermentation qu'aucune analyse préalable du moût ne permet de prévenir à coup sur ; d'autre part, elle explique pourquoi l'addition de sels d'ammonium ne constitue pas une panacée puisqu'elle ne traite que le cas relativement simple des carences en azote assimilable.

Le but de cette étude était d'élaborer un activateur de fermentation spécifique qui puisse être ajouté au moût de fermentation afin de prévenir (ou traiter) la majorité des cas d'arrêt de la fermentation.

La formule élaborée comporte des sels d'ammonium, de la thiamine et des levures inactivées thermiquement. La souche de Saccharomyces cerevisiae utilisée a été sélectionnée pour sa haute teneur en ergostérols et en zymostérols.

► Les principales causes des problèmes de fermentation

De nombreuses causes de ralentissement ou d'arrêt de la fermentation ont été signalées (Tableau 1) que l'on peut classer en trois catégories :

- Celles dues à la composition initiale du moût : déficiences en azote assimilable et en vitamines telles que la thiamine (Bataillon et al. 1996), concentrations élevées en sucres fermentescibles, valeurs basses de pH ;
- Une maîtrise insuffisante des procédés de vinification lors des étapes de clarification, de levurage (choix inadéquat de la souche, mauvaise réhydratation et acclimatation au moût), d'oxygénation et de contrôle de la température (Ribereau-Gayon et al. 1998 ; Sablayrolles, 1998) ;
- La production par les levures d'inhibiteurs tels que l'éthanol, le gaz carbonique et les acides gras saturés en C8 et C10 (Lafon-Lafourcade et al. 1984).

Les problèmes de fermentation sont rarement dus à une seule cause mais plutôt à la combinaison de divers facteurs qui entraînent une perte de viabilité importante des levures.

Cependant, il a été prouvé que certaines causes surviennent plus fréquemment que d'autres (Sablayrolles et al. 1996). L'azote disponible est essentiel pour favoriser le développement exponentiel initial de la levure, mais aussi pour permettre le renouvellement continu du « pool » de protéines enzymatiques et de transporteurs trans-membranaires.

L'augmentation de la teneur en éthanol des moûts en fermentation a un effet sur la perméabilité de la membrane cytoplasmique des levures et donc sur l'activité des transporteurs trans-membranaires de sucre (Salmon, 1989).

Les sucres résiduels, dominés par le fructose, ne peuvent ainsi pas être métabolisés par la levure et donc fermentés. En fait, les levures doivent adapter la composition de leur membrane plasmique par la synthèse continue de stérols et d'acides gras insaturés. Cette synthèse se produit en présence d'une concentration minimale d'oxygène dissout.



► Elaboration d'un bio-régulateur spécifique de fermentation

Composition

Le but de la présente étude était d'élaborer un bio-régulateur de fermentation complexe afin de fournir une solution à la plupart des causes des problèmes de fermentation rencontrés par les vinificateurs. La composition de cet activateur (Maxaferm®) et l'importance de chacun des composants sont indiquées dans le Tableau 2.

L'optimisation de la composition a été essentiellement basée sur le choix de la souche de *S. cerevisiae* retenue pour la formulation du produit. A cette fin, nous avons passé au crible l'ensemble des souches de levure produites par le groupe DSM afin de déterminer leurs teneurs respectives en ergostérols, zymostérols, tréhalose et glutathion. Le département de recherche de DSM a identifié les souches de levure ayant les teneurs en stérols les plus élevées et a retenu la plus efficace pour la formulation finale de l'activateur de fermentation. Au cours de cette phase d'optimisation, l'efficacité des produits a été testée comme la réduction du temps de fermentation d'un moût de Chardonnay qui présentait, dans des conditions normales, un ralentissement de fermentation.

La formule de Maxaferm® permet donc à la fois d'éviter et de traiter les ralentissements et les arrêts de fermentation.

La présence de levures inactivées permet l'évacuation du CO₂ et l'adsorption des métabolites toxiques de levure (acides gras saturés à chaînes courtes) ainsi que l'apport de stérols, de phospholipides, d'acides aminés et d'autres micro-nutriments pour les levures de fermentation.

Maxaferm® comprend également de la thiamine et des sels d'ammonium qui favorisent la croissance et le renouvellement continu des enzymes du métabolisme, permettant ainsi d'améliorer la viabilité des levures.

► Essai en vinifications modèles pour la prévention de fermentations languissantes

L'impact de Maxaferm® sur la vitesse de fermentation a été testé en réalisant des micro-vinifications de moûts de Chardonnay qui présentaient une fermentation languissante dans des conditions standardisées, la température de fermentation étant fixée à 24 °C.

La vitesse de fermentation a été suivie par mesure de la production de gaz carbonique (Sablayrolles et al. 1987).

Les moûts utilisés ont tous conduit à des fermentations lentes, de durées supérieures à 300 heures, ceci indépendamment de la souche de levure ajoutée. Les différentes levures sèches actives ont été ajoutées à 20 g/hl.

► Importance des conditions d'apport sur la durée totale de fermentation

Nous avons comparé l'efficacité de l'activateur de fermentation en fonction du moment et des conditions d'apport au moût.

Lorsque l'activateur de fermentation a été ajouté à l'encuvage, à une dose 300 mg/l, le principal effet observé a été une réduction de la phase de latence et un démarrage rapide de la phase de croissance exponentielle des levures (Figure 1).

Cet apport précoce d'activateur n'a, par contre, pas eu d'effet décelable sur la durée totale de fermentation, le pourcentage de viabilité des levures et les teneurs en sucres résiduels après 200 h de fermentation. A l'inverse, une addition à mi-fermentation a eu un effet immédiat de réactivation de la fermentation alcoolique qui s'est achevée en moins de 200 heures.

Un ajout fractionné de 2 x 150 mg/l, ajoutés respectivement au début et à mi-fermentation, a également eu un impact très positif sur la vitesse de fermentation (non représenté).

► Impact de différents types d'activateurs sur la vitesse de fermentation et la viabilité des levures

L'effet de l'adjonction de Maxaferm® a été comparé à celui du phosphate di-ammonique dosé à 20 g/hl, seul ou combiné à une oxygénation modérée (7 mg/l).

Ces essais ont montré que le traitement le plus efficace pour la prévention de fermentation languissante est l'adjonction simultanée de 300 mg/l de Maxaferm® et d'oxygène à mi-fermentation (Figure 2). Dans cet essai, la fermentation s'est achevée au bout de 150 heures alors que le moût témoin contenait plus de 10 g de sucres résiduels au bout de 300 heures. Ces résultats sur la durée totale de fermentation étaient en parfaite corrélation avec les valeurs de viabilité des levures en fin de fermentation (Figure 3).

Les autres modalités testées (phosphate di-ammonique et oxygène, ajoutés seuls ou combinés) ont donné des résultats intermédiaires sur ces deux critères. Dans les échantillons traités avec Maxaferm®, seul ou combiné à de l'oxygène, les levures viables représentaient en fin de fermentation plus de 50 % des cellules totales, alors que la viabilité en fin de processus avec les autres traitements testés était de l'ordre de 40-45 %.

▶ Essais de vinification et conséquences sur les caractéristiques du vin

Influence sur la durée totale de fermentation

Des essais de vinifications modèles ont été réalisés durant les vendanges 1999 en collaboration avec le Centre Technique Interprofessionnel de la Vigne et du Vin (ITV-France, Tours). Le moût utilisé avait été obtenu à partir de Sauvignon blanc, sulfité à 5 g/hl, et clarifié après addition d'enzyme pectolytique (Rapidase® CB) à 2 g/hl. La concentration initiale de sucres réducteurs était proche de 200 g/l. Après levurage (Collection Cépage Sauvignon LW07) à 20 g/hl, la fermentation alcoolique du moût témoin s'est achevée après 17 jours à une température comprise entre 19 et 20 °C.

On peut donc en conclure que le moût témoin utilisé pour les tests ne présentait pas de problème spécifique conduisant à un arrêt de la fermentation.

L'apport de Maxaferm® à 30 g/hl, après une diminution de 0,035 de la densité (4ème jour de fermentation) a permis une réduction à 13 jours de la durée totale de fermentation.

L'utilisation de cet activateur constitue donc un moyen efficace de réduction des durées de fermentation et d'optimisation de la gestion de la cuverie dans les établissements vinicoles.

Impact sur les caractéristiques des vins obtenus

Les différents échantillons de Sauvignon blanc fermentés sans (témoin) et avec adjonction de 30 g/hl de Maxaferm® ont été soumis à des analyses œnologiques (Tableau 3) et à une évaluation sensorielle. La comparaison des profils analytiques des vins (Tableau 3) montre que l'utilisation de l'activateur de fermentation a eu un effet positif sur plusieurs paramètres importants comme :

- la concentration finale en sucres réducteurs est plus faible,
- l'acidité volatile a été réduite de 0.17 g/l, soit une réduction de plus de 30 % par rapport au vin témoin,
- la teneur en glycérol a été augmentée de 10 %.

D'autres paramètres tels que le titre alcoométrique volumique, l'acidité totale, ou l'absorbance à 420 nm n'ont pas été modifiés.

Ces mêmes vins ont été soumis à une évaluation sensorielle par le jury de l'ITV-France experts de la zone de la Vallée de la Loire. Le jury a évalué des paramètres sensoriels tels que l'odeur, l'intensité et la qualité, le goût, l'aspect visuel, l'équilibre, le moelleux, l'amertume, l'acidité,... et les résultats ont été soumis à une interprétation statistique. Les deux vins ont été jugés identiques sur chaque paramètre évalué.

L'adjonction de Maxaferm® pendant la fermentation n'a pas entraîné de modification sensorielle du vin.

Essais de vinification : effet-dose et durée totale de fermentation

Des essais de vinifications modèles ont été réalisés durant les dernières vendanges en collaboration avec le CIVAM de la région Corse. Le moût utilisé avait été obtenu par pressurage direct de Vermentino blanc, sulfité à 4 g/hl, et clarifié par débouillage statique après addition d'enzyme pectolytique (Rapidase CB®) à 2 g/hl. La turbidité initiale a été ajustée à 100 NTU avant levurage à 20 g/hl avec la souche Equinox B1. La vendange retenue pour cette étude provenait d'une parcelle identifiée comme donnant des moûts à fermentations languissantes. La fermentation du moût ainsi obtenu (TAP de 13,5 % vol) a ainsi duré 31 jours à une température de 18-19 °C. L'apport de Maxaferm® a été réalisé au 2ème jour de fermentation et un effet dépendant de la dose a pu être observée. Un apport de 10 g/hl a permis de réduire la durée totale de fermentation à 21 jours, une dose de 30 g/hl a eu un effet spectaculaire puisque la fermentation était achevée en 13 jours, soit une réduction de près de 60 % par rapport au témoin. Les caractéristiques analytiques et sensorielles (évaluation par le jury du CIVAM Corse) des vins obtenus ne présentaient pas de différence significative. Ce nouvel essai confirme donc l'intérêt de ce bio-régulateur de fermentation comme un outil dans la gestion de la cuverie dans les établissements vinicoles, sans que la qualité des vins en soit modifiée.

Conclusion

L'activateur de fermentation élaboré par le département de recherche de DSM et testé dans la présente étude s'est révélé un moyen très efficace pour réduire le temps de fermentation alcoolique et éviter les principales causes des problèmes de fermentation. L'adjonction de Maxaferm® à mi-fermentation permet une réduction importante de la fréquence et de l'intensité des difficultés fermentaires (ralentissement ou arrêt). De plus, certains paramètres analytiques peuvent être améliorés sans entraîner la moindre modification sensorielle des vins.

Ce produit peut également être utilisé dans le traitement de l'arrêt de la fermentation, en parallèle avec l'inoculation de souches telles que la Fermichamp® (souche 67J INRA Narbonne).

Tableau 1 :
Principales causes des problèmes de fermentation.

COMPOSITION DU MOÛT		
Facteur	Conséquence	Commentaires
Carence en azote.	Croissance exponentielle des levures et vitesse de fermentation faibles.	La teneur du moût dépend : ■ du terroir et du mode de conduite de la vigne (enherbement,...), ■ de la variété, ■ de la maturité du raisin.
Concentration élevée en sucres réducteurs.	Mortalité initiale des levures et teneurs finales en alcool élevées.	Le choix de souches de levures résistantes aux pressions osmotiques ainsi qu'aux teneurs en alcool élevées permet de s'affranchir de ce problème.
Carence en thiamine.	Limitation de la multiplication des levures.	La thiamine doit être ajoutée très tôt, avant la fermentation, pour favoriser le développement des levures.

PROCESSUS DE VINIFICATION		
Facteur	Conséquence	Commentaires
Excès de SO ₂ .	Inhibition des levures. Forte concentration en éthanol.	La toxicité augmente avec un pH bas et une clarification excessive.
Moût appauvri en certains éléments nutritifs.		Les bourbes : ■ contiennent des lipides (acides gras insaturés) ■ permettent la nucléation du CO ₂ puis son élimination. La turbidité du moût doit être maintenue de 80 à 200 NTU selon l'état sanitaire de la vendange et la souche de levure utilisée.
Carence en oxygène.	Toxicité accrue de l'alcool qui entraîne perte de viabilité des levures.	L'effet des carences en oxygène est aggravé par une clarification et par des mesures de protection excessives contre l'oxydation. En ajoutant de l'oxygène à la moitié de la fermentation, le risque d'oxydation est pratiquement négligeable.
Températures extrêmes.	Une température supérieure à 32°C favorise la mortalité des levures. Une température inférieure à 15°C ralentit leur activité.	De fortes différences de tolérance aux températures extrêmes existent entre les différentes souches de levure. La chaleur amplifie l'effet de l'alcool sur la membrane de la levure. Eviter tout choc thermique supérieur à 10 °C au moment de l'inoculation (perte de viabilité de la population initiale de levures).

MÉTABOLITES AUTO-TOXIQUES DE LA LEVURE		
Facteur	Conséquence	Commentaires
Ethanol.	L'éthanol, en synergie avec d'autres inhibiteurs, entraîne la mortalité des levures.	Le pouvoir alcoogène des levures sélectionnées est supérieur à celui des flores de levures indigènes.
Excès de CO ₂ .	Mortalité des levures.	Certaines souches de levure tolèrent un niveau élevé de CO ₂ .
Acides gras C8, C10.	Toxique pour les levures de fermentation.	La paroi cellulaire des levures adsorbe ces inhibiteurs.

Tableau 2 :
Composition de l'activateur de fermentation mis au point.

Composé	Commentaires
Levures inactivées.	Elimination du gaz carbonique. Adsorption des acides gras toxiques. Source de stérols, glutathion, acides aminés et oligo-éléments.
Ammonium sulfate, Di-ammonium hydrogénophosphate.	Favorisent la multiplication et la viabilité à long terme des levures.
Thiamine.	Favorise la croissance exponentielle des levures.

Tableau 3 :
Analyses comparées des vins blancs Sauvignon fermentés sans (témoin) et avec apport de 30 g/hl de Maxaferm® après 4 jours de fermentation. Données : ITV-France (Tours).

Paramètre	Témoin	Vin obtenu avec Maxaferm®
Sucres réducteurs (g/l)	1,3	0,9
Acidité volatile (g/l-H ₂ SO ₄)	0,46	0,29
Titre alcoométrique (% vol)	12,3	12,4
pH	3,08	3,03
Acidité totale (g/l-H ₂ SO ₄)	5,25	5,5
Glycérol (g/l)	5,9	6,5
Potassium (g/l)	0,52	0,54
Absorbance à 420 nm/1 cm	0,035	0,034

Figure 1 :
Vitesse de fermentation alcoolique d'un moût de Chardonnay qui a donné un ralentissement de la fermentation : Témoin (courbe bleue), après apport de 300 mg/l de Maxaferm® au début (courbe verte) et à mi-fermentation (courbe rouge).
Données : UMR Sciences pour l'Oenologie (INRA-Montpellier, France)

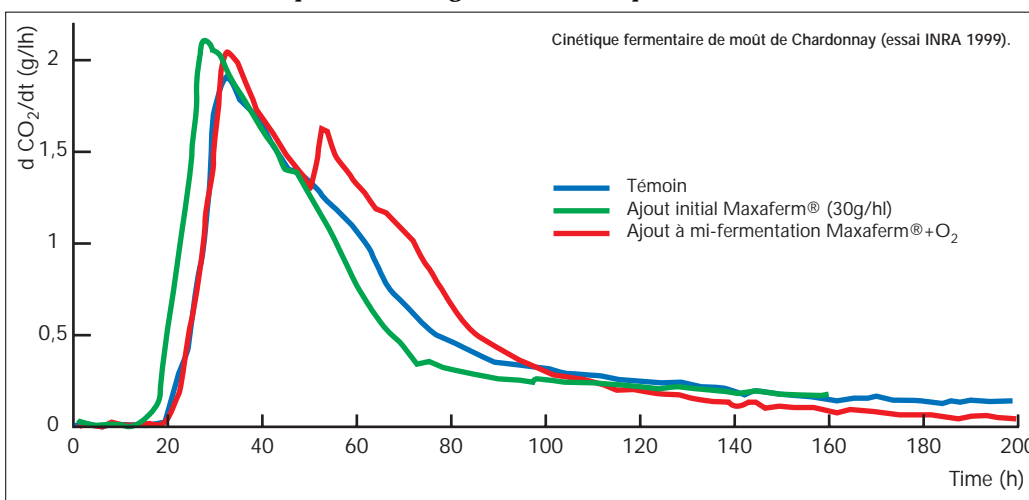


Figure 2 :

Achèvement de la fermentation obtenue par différents traitements d'un moût de Chardonnay : addition de di-ammonium hydrogénophosphate (200 mg/l) et de Maxaferm® (300 mg/l), seuls ou combinés à de l'oxygène (7 mg/l), apports réalisés lorsque la densité du moût a atteint 1040.

Données : UMR Sciences pour l'Oenologie (INRA-Montpellier, France).

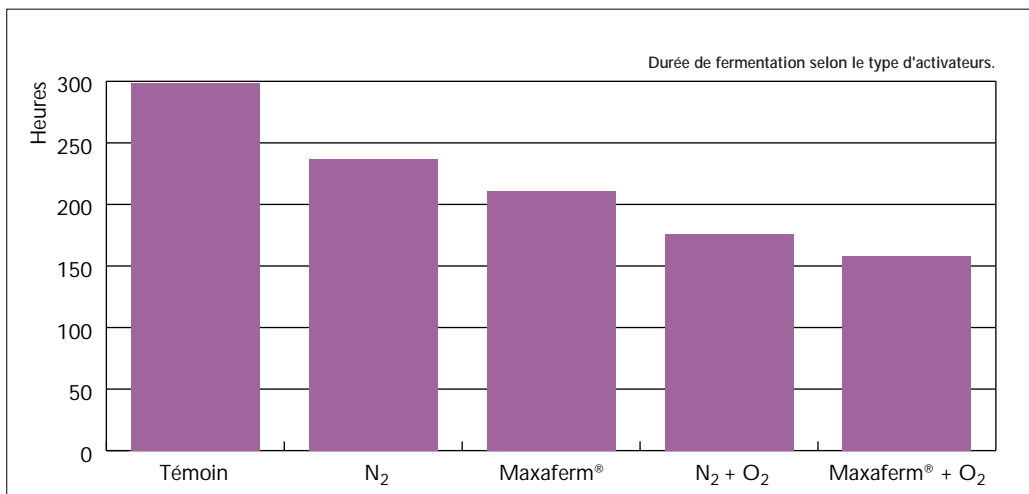
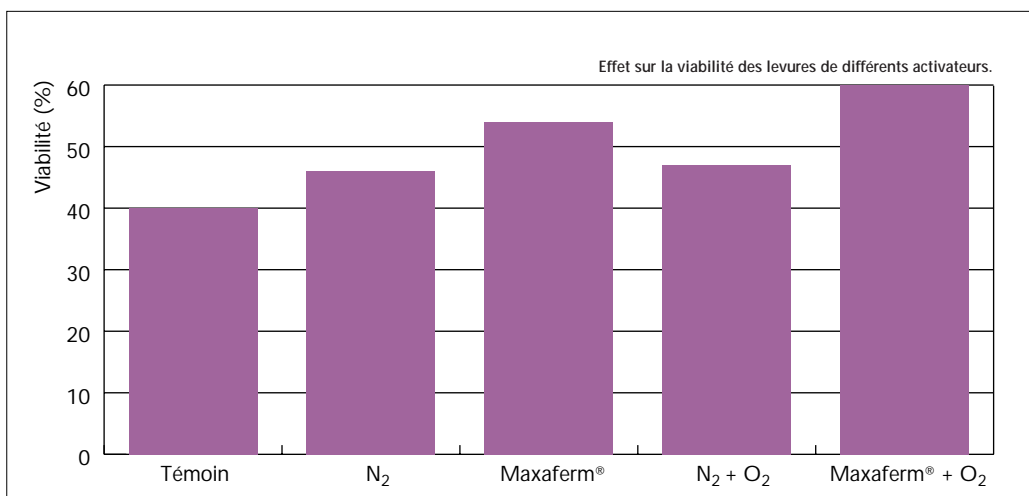


Figure 3 :

Viabilité des cellules de levure (en %) en fin de la fermentation alcoolique d'un moût de Chardonnay soumis à différents traitements : ajout de di-ammonium hydrogénophosphate (200 mg/l) et de Maxaferm® (300 mg/l), seuls ou combinés à de l'oxygène (7 mg/l), lorsque la densité du moût a atteint 1040.

Données : UMR Sciences pour l'Oenologie (INRA-Montpellier, France).



Patrice Pellerin
 Research Application Manager
 DSM Food Specialties Oenology

■ Remerciements :

Les auteurs souhaitent remercier Mme Nathalie Uscidda du CIVAM de la région Corse pour la réalisation des essais de vinification de Vermentino blanc, Mr. Christian Picou et le Dr. Jean-Marie Sablayrolles de l'Unité Mixte de Recherche Sciences pour l'Oenologie (INRA-Montpellier) pour la réalisation des essais de micro-vinification.

References :

Bataillon M., Rico A., Sablayrolles J.M., Salmon J.M., Barre P. (1996) Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferm. Bioeng.* 82: 101-106.

Lafon-Lafourcade S., Geneix C., Ribereau-Gayon P. (1984) Inhibition of alcoholic fermentation of grape musts by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1246-1249.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (1998) *Traité d'Oenologie. Vol 1. Microbiologie du Vin, Vinifications.* Dunod, Paris.

Sablayrolles J.M. (1998) *Conduite de la fermentation alcoolique.* In : *Oenologie. Fondements Scientifiques et Technologiques.* Flanzy (ed.) Lavoisier Tec&Doc, Paris: 415-444.

Sablayrolles J.M., Barre P., Grenier P. (1987) Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotech. Techniques.* 1: 181-184.

Sablayrolles J.M., Dubois C., Manginot C., Roustan J.L., Barre P. (1996) Effectiveness of ammoniacal nitrogen and oxygen combined additions during sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferm. Bioeng.* 82: 145-150.

Salmon J.M. (1989) Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 953-958.