



**HAL**  
open science

# Étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise et impact des procédés émergents sur la fermentation du jus en vue de l'élaboration du cidre

Marina Al Daccache

► **To cite this version:**

Marina Al Daccache. Étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise et impact des procédés émergents sur la fermentation du jus en vue de l'élaboration du cidre. Génie des procédés. Université de Technologie de Compiègne; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Faculté des Sciences, 2019. Français. NNT : 2019COMP2527 . tel-02953958

**HAL Id: tel-02953958**

**<https://theses.hal.science/tel-02953958v1>**

Submitted on 30 Sep 2020

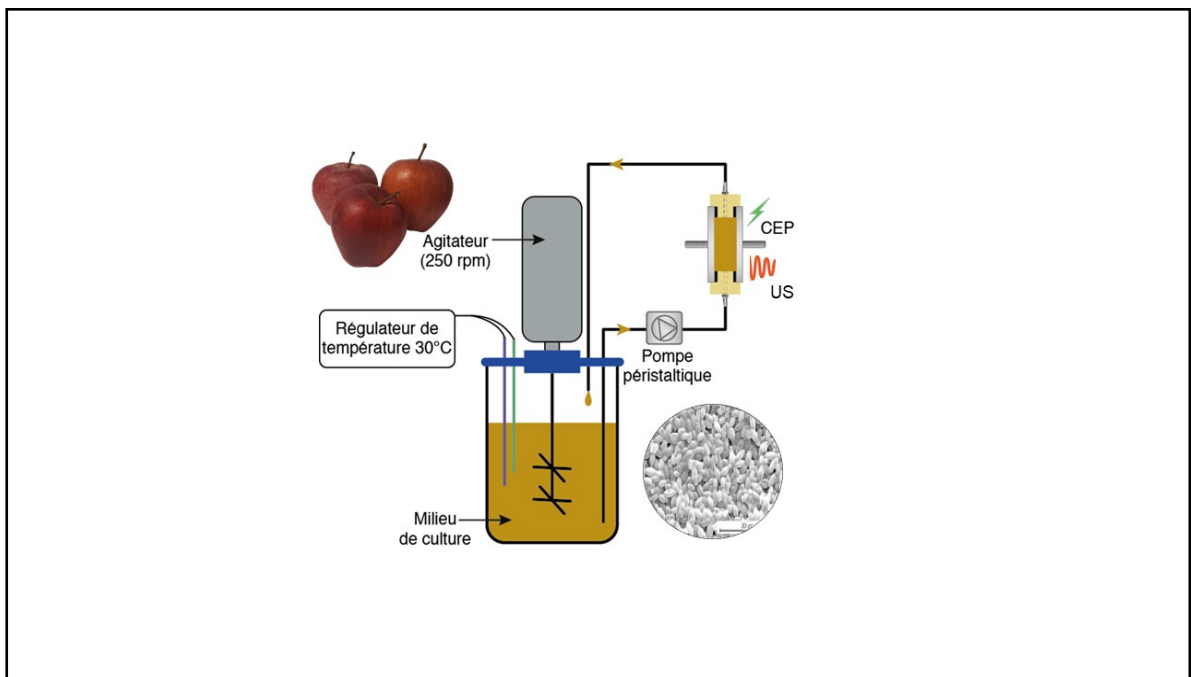
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par Marina AL DACCACHE

*Étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise et impact des procédés émergents sur la fermentation du jus en vue de l'élaboration du cidre*

Thèse présentée en cotutelle  
pour l'obtention du grade  
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 10 décembre 2019

**Spécialité** : Génie des Procédés Industriels et développement durable :  
Transformations intégrées de la matière renouvelable (EA-4297)

D2527

## THÈSE DE DOCTORAT

Présentée pour obtenir les titres de Docteur de :

**L'UNIVERSITÉ SAINT-JOSEPH DE BEYROUTH,  
FACULTÉ DES SCIENCES  
SPÉCIALITÉ : CHIMIE**

ET

**L'UNIVERSITÉ DE TECHNOLOGIE DE COMPIÈGNE,  
SPÉCIALITÉ : GÉNIE DES PROCÉDÉS INDUSTRIELS ET DÉVELOPEMENT  
DURABLE**

Sujet de la thèse :

**Étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise et impact des  
procédés émergents sur la fermentation du jus en vue de l'élaboration du  
cidre.**

Présentée par :

**AL DACCACHE Marina**

Soutenue le 10 décembre 2019

### **Devant le jury composé de :**

Pr. Joseph SAAB	Examineur
Pr. Ali ATOUI	Rapporteur
Dr. Maryline VIAN	Rapporteur
Pr. Nada EL DARRA	Examineur
Dr. Mohamed KOUBAA	Examineur
Pr. Richard G MAROUN	Examineur
Pr. Eugène VOROBIEV	Directeur de thèse
Pr. Nicolas LOUKA	Directeur de thèse
Pr. Salim DACCACHE s.j.	Membre invité
Pr. Dominique SALAMEH	Membre invité

---

## Remerciements

---

*A ce moment, je ne peux qu'être convaincue que le travail de recherche et la réalisation d'une thèse est de loin un travail individuel. Devant cela, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont transmis le savoir, qui m'ont soutenu et qui ont fait route avec moi tout au long de ces trois ans de thèse.*

*Ce travail ne sera pas réalisé sans le soutien financier de divers contributeurs. Je tiens alors à remercier en premier lieu le conseil de la recherche de l'Université Saint – Joseph de Beirut pour la bourse qu'il m'ont accordé. Par la suite, ma profonde reconnaissance part à l'équipe du Pr VOROBIEV de l'Université de Technologie de Compiègne pour sa participation au financement et pour son accueil durant ces trois années de thèse. Je remercie pareillement le CNRS libanais et Campus France.*

*Mes plus sincères remerciements partent à mes directeurs de thèse : Pr **Eugène VOROBIEV** qui m'a partagé et m'a communiqué son expertise, ses compétences et qui a guidé par ses conseils ce travail avec beaucoup de pédagogie, et Pr **Nicolas LOUKA** qui m'a attribué sa confiance et qui a consacré son temps pour diriger ce travail, je le remercie également pour sa rigueur, son exigence pour mener à point ce travail et également pour son soutien permanent même de loin.*

*J'exprime mon admiration pour le **Pr Richard MAROUN** n'ont seulement en tant que mon co-directeur mais aussi en tant que le doyen de la Faculté des Sciences à l'USJ. Vous m'aviez accompagné dès mes premiers jours à la faculté, vous étiez toujours à l'écoute, prêts à me guider en tout moment. Merci pour vos conseils et motivations, de m'avoir rassuré dans les moments difficiles et surtout pour votre expertise et soutien scientifique.*

*Toute ma gratitude à mon co-directeur **Dr. Mohamed KOUBAA**, sans votre engagement ce travail n'aura pas été comme suit. Merci pour votre présence et disponibilité, d'avoir suivi de très près ce travail et pour les moments de réflexions et de partage scientifiques. Vous m'avez remotivé dans les moments de doute, aidé à surmonter les difficultés qu'on a rencontré, et surtout vous m'avez partagé votre expertise dans la rédaction des articles.*

*Je voudrais remercier **Dr Dominique SALAMEH**, la thèse aura été beaucoup plus difficile sans vos conseils, corrections et directives particulièrement sur la fermentation. Il est difficile de décrire cette générosité de partager avec moi votre passion à la fermentation, vous m'avez permis de découvrir ce monde en me poussant à lire et chercher encore plus loin. Vous étiez toujours présent à l'écoute, pour réfléchir ensemble et notamment pour me remotiver. Tous vos conseils me sont assez chers, je les porterai avec moi au cours de mon chemin dans cette vie. Je retiendrai toujours que « la chance ne sourit qu'aux âmes bien préparées » et surtout « il ne faut jamais solliciter la jalousie ».*

*Je tiens à remercier spécialement **Dr Laure EL CHAMY** pour sa collaboration dans ce travail, ses conseils, son attention ainsi que pour le temps qu'elle m'a accordé pour réalisation à point l'étude et l'identification de la souche indigène.*



*Je remercie également **Dr. Nicolas THIEBAULT** pour son aide lors de la performance des analyses HPLC à l'ESCOM.*

*Pour tous les membres du jury, merci d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse, ainsi que pour vos conseils et disponibilité.*

*Je remercie vivement tous ceux qui m'ont aidé d'une manière directe ou pas, mes collègues et amis au département de génie des procédés industriels **Kaidi, Mathieu, Morad, Rui, Lu, Nina, Pierre, Lucie, Sally, Laurine, Sarra** ; tout le personnel du service technique et informatique ainsi que **Dr Nabil GRIMI, Dr Nadia BOUSSETA, Dr Olivier BALS, Dr Houcine MHEMDI, Dr. Maurice NONUS, Mme Muriel GROMARD, Mme Marie LOTIQUET, M. Bruno DAUZAT, M. Hervet LECLERC.***

*Je ne pourrais point oublier mes amis en France **May, Youssef, Sarra, Farouk, Joey, Gabriel, Nadim, Sakr.** Je vous remercie vivement d'avoir été ma famille à Compiègne.*

*Merci à ma grande famille à l'USJ, pour leur contribution de loin et de près à la réussite de ce travail. Un merci tout particulier à **Pr Roger LTEIF** pour son soutien et sa motivation permanente, ainsi qu'à **Dr Charbel AFIF** qui a cru en moi dès le premier TP de chimie général en licence et m'a soutenu dans toutes circonstances. Amis et collègues à l'USJ je tiens à vous remercier pour votre support moral et technique, vous étiez toujours là à l'écoute **Hussein, Rim, Hadi, Nadine, Nay, Rindala, Sally, Elena, Rebecca, Anna-Maria, Rancy, Nancy, Elie, Perla, Carine, Lilyann, Rhéa, Carole, Layal, Maria, Joanna, Ghina, Rouaa** et toutes celles et ceux dont je ne cite pas leurs noms mais que je remercie également du fond du cœur.*

*Enfin, je remercie mes parents qui ont su croire en moi et qui m'ont apporté toute leur aide quand j'en ai eu besoin. Je remercie toute ma famille qui a contribué de près ou de loin à ce que je suis devenue.*

---

## Résumé

---

Ce travail de thèse concerne la valorisation des pommes libanaises en évaluant leur potentiel fermentaire en vue de l'élaboration du cidre, spécifiquement l'étape de la fermentation de ce processus. Pour cette fin, l'analyse de la composition chimique des pommes libanaises « Ace spur » a été effectuée en comparaison avec une pomme à cidre « Kermerrien » utilisée industriellement en France pour la production du cidre. La variété de pomme libanaise « Ace spur » semble être convenable pour l'élaboration de cidre. De plus, une souche responsable de la fermentation spontanée de cette variété de pommes a été isolée et identifiée. Son potentiel fermentaire dans ces deux variétés de pommes a été par la suite étudié. La levure *Hanseniaspora* sp. isolée permet la fermentation des jus de pommes jusqu'à 4% (v,v) d'éthanol. Cette étude fournira pour la première fois des données sur la composition chimique de la pomme libanaise, sur une souche présente lors de sa fermentation, ainsi que sur son potentiel fermentaire. Également, les travaux de la thèse consistent à évaluer l'impact des procédés émergents : champs électriques pulsés et ultrasons sur la fermentation. Ces travaux visent à démontrer le potentiel d'implémentation de ces procédés industriellement. Nous proposerons une approche de traitement du jus de pommes en continu qui pourra être transposée de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle. L'application des technologies émergentes (champs électriques pulsés et ultrasons) induit une accélération des cinétiques fermentaires et une réduction du taux d'éthanol.

**Mots clés :** pommes libanaises, fermentation, cidre, levure indigène, *Hanseniaspora* sp., champs électriques pulsés, ultrasons, cinétiques, faible teneur en alcool.

---

## Abstract

---

This work concerns the valorization of Lebanese apples by evaluating its potential to produce cider, specifically the fermentation stage of this process. For this purpose, the chemical composition of the Lebanese apples "Ace spur" was analyzed in comparison with a cider apple "Kermerrien" used industrially in France for cider production. The Lebanese apple variety "Ace spur" appears to be suitable for cider making. In addition, a strain responsible for the spontaneous fermentation of this variety of apples was isolated and identified. Its fermenting potential in these two varieties of apples has been studied. The isolated yeast *Hanseniaspora* sp. can ferment apple juices up to 4% ethanol (v,v). This study will provide first-time data on the chemical composition of the Lebanese apple, on the potential of a strain present during its fermentation. Also, this work evaluates the impact of emerging technologies like pulsed electric field and ultrasound on yeast fermentative activity. A continuous apple juice treatment that can be scaled from laboratory to industrial scale is proposed. The various results obtained showed the chemical potential of the Lebanese variety "Ace spur" in cider production. The application of those emerging technologies can accelerate growth kinetics while reducing ethanol contents.

**Key words:** Lebanese apples, fermentation, cider, indigenous yeast, *Hanseniaspora* sp., pulsed electric fields, ultrasound, kinetics, low alcohol content

---

## Valorisation des travaux de recherche

---

### Brevet

---

**Al Daccache, M.**, Salameh D., El Chamy L., Maroun R. et Louka N. (2017), Nouvelles souches de levure indigènes “*Hanseniaspora Meyeri-Libani*” pour l’élaboration du cidre. : brevet 12017 / 10-11265L

### Articles publiés

---

**Al Daccache, Marina**, Mohamed Koubaa, Dominique Salameh, Eugène Vorobiev, Richard G. Maroun, and Nicolas Louka. 2020. “Control of the Sugar/Ethanol Conversion Rate during Moderate Pulsed Electric Field-Assisted Fermentation of a *Hanseniaspora* sp. Strain to Produce Low-Alcohol Cider.” *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 59: 102258. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102258>.

**Al Daccache, Marina**, Mohamed Koubaa, Richard G. Maroun, Dominique Salameh, Nicolas Louka, and Eugène Vorobiev. 2020. “Pulsed Electric Field-Assisted Fermentation of *Hanseniaspora* Sp . Yeast Isolated from Lebanese Apples.” *Food Research International* 129(November 2019):108840. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108840>

**Al Daccache Marina**, Mohamed Koubaa, Dominique Salameh, Richard G Maroun, Nicolas Louka, and Eugène Vorobiev. 2020. “Ultrasound-Assisted Fermentation for Cider Production from Lebanese Apples.” *Ultrasonics Sonochemistry*, 104952. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104952>

### Articles en cours de révision

---

Evaluation of the fermentative capacity of an indigenous *Hanseniaspora* sp. strain isolated from Lebanese apples for cider production, *FEMS Microbiology Letters*

Suitability of the Lebanese “Ace spur” apple variety for cider production using *Hanseniaspora* sp. yeast, *Fermentation*

### Communications affichées

---

**Marina Al Daccache**, Mohamed Koubaa, Dominique Salameh, Richard G. Maroun, Nicolas Louka, Eugène Vorobiev: *Pulsed electric field-assisted fermentation of Hanseniaspora sp. yeast isolated from Lebanese apples*. 3rd World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies, Toulouse; 09/2019

**Marina Daccache**, Dominique Salameh, mohamed koubaa, Richard G. Maroun, Eugène Vorobiev, Nicolas Louka: *Quantitation of total polyphenol content in lebanese apple used for cider production*. 18th ISANH Middle East Antioxidants World Congress – Beirut Antioxidants 2017, Saint Joseph University of Beirut, Lebanon - May 3-4, 2017; 05/2017, DOI:10.18143/JISANH\_v4i1-44

---

## Nomenclature et abréviations

---

### Désignation latine

---

<i>a</i>	nombre d'impulsions ultrasons
<i>d</i>	facteur de dilution
<i>Da</i>	diamètre arithmétique (mm)
<i>De</i>	diamètre équivalent (mm)
<i>Dg</i>	diamètre moyen géométrique (mm)
<i>E</i>	intensité du champ électrique (V/cm)
<i>E</i>	énergie (Wh) fournie par le générateur d'ultrason
<i>G1</i>	stade 1 du cycle cellulaire
<i>G2</i>	stade 2 du cycle cellulaire
<i>I</i>	intensité (A)
<i>L</i>	diamètre polaire (mm)
<i>M</i>	mitose
<i>N</i>	nombre de carrés comptés de la cellule de thoma
<i>n</i>	succession de trains
<i>n</i>	nombre de cellules comptées
<i>P<sub>0</sub></i>	concentration initiale du produit (g/L)
<i>P<sub>f</sub></i>	concentration finale du produit (g/L)
<i>S</i>	surface (mm <sup>2</sup> )
<i>S<sub>0</sub></i>	concentration initiale du substrat (g/L)
<i>S<sub>f</sub></i>	concentration finale du substrat (g/L)
<i>t</i>	temps (s)
<i>T</i>	diamètre équatorial (mm)
<i>t<sub>0</sub></i>	temps initial (s)
<i>t<sub>f</sub></i>	temps final (s)
<i>t<sub>CEP</sub></i>	durée de traitement électrique effectif (s)
<i>t<sub>i</sub></i>	durée d'une impulsion électrique (s)
<i>t<sub>us</sub></i>	durée de traitement ultrason effectif (s)
<i>U</i>	tension (V)
<i>V</i>	volume dans le réacteur (mL)
<i>V</i>	volume du fruit (mm <sup>3</sup> )
<i>v, v</i>	volume, volume
<i>W</i>	consommation d'énergie spécifique (J/mL)
<i>W</i>	diamètre de suture (mm)
<i>X</i>	concentration de microorganismes par mL
<i>Y<sub>P/S</sub></i>	rendement en éthanol
<i>Y<sub>X/S</sub></i>	rendement en biomasse
<i>Δt</i>	temps entre les trains (s)
<i>Δt<sub>i</sub></i>	durée de période d'impulsion électrique (s)
<i>Δt<sub>p</sub></i>	durée de période d'impulsion ultrasons (s)

## Lettre grecques

---

$\gamma$	vitesse spécifique de production d'éthanol ( $g_{ethanol} / g_{biomasse} \cdot h$ )
$\mu$	vitesse de croissance spécifique ( $h^{-1}$ )

## Abréviations

---

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
CEM	champs électriques modérés
CEP	champs électriques pulsés
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
F6P	fructose-6-phosphate
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAE	gallic acid equivalent
HK	hexokinase
HPLC	high performance liquid chromatography
HXT	transporteurs d'hexose
IFPC	institut français des productions cidricoles
ITS	espaceurs internes transcrits
JC	Jesus Christ
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
PCR	amplification en chaîne par polymérase
PGI	phosphoglucose-isomérase
RC	résistance-capacité
UFC	unité formant colonie
US	ultrasons
YPD	Yeast Peptone Dextrose

---

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1.1.</b> Teneur en sucres simples et pariétaux des pommes (Belitz et al., 2009; Renard et al., 2001). .....	22
<b>Tableau 1.2.</b> Pourcentage de lipides dans les pommes (Belitz et Grosch, 2009). .....	24
<b>Tableau 1.3.</b> Concentrations des minéraux dans les pommes (Belitz et Grosch, 2009).....	25
<b>Tableau 1.4.</b> Classification des variétés des pommes à cidre en fonction de leurs caractéristiques gustatives.....	27
<b>Tableau 2.1.</b> Composition des milieux de culture synthétiques. ....	70
<b>Tableau 2.2.</b> Caractéristiques du générateur 400 V- 38 A.....	72

---

## Liste des figures

---

<b>Figure 1.1.</b> Cinétiques de croissance microbienne.....	18
<b>Figure 1.2.</b> Schéma récapitulatif de l'élaboration du cidre. ....	21
<b>Figure 1.3.</b> Structures de différentes formes de catéchines et proanthocyanidines (Xu, Xu et Zheng, 2017).....	23
<b>Figure 1.4.</b> A. Représentation du volume et des valeurs de l'exportation, et B. de l'importation des pommes au Liban de 2012 jusqu'en 2016 (Saadeh, 2016).....	26
<b>Figure 1.5.</b> Photo de différents angles de la variété de pommes "Kermerrien".....	27
<b>Figure 1.6.</b> Schéma d'une cellule de levure adapté de Gaillardin et Heslot, (1987).....	30
<b>Figure 1.7.</b> Voie métabolique de la glycolyse (Concetta Compagno, Sofia Dahko, 2014). ...	33
<b>Figure 1.8.</b> Une vue schématique des voies respiratoire et fermentaire de la levure adaptée de Thierie et Penninckx (2010).....	34
<b>Figure 1.9.</b> Schématisation adaptée de Martín <i>et al.</i> , (2018) des composés aromatiques de fermentation produits par les levures <i>Hanseniaspora</i> lors de la production de vin (en rouge et vert), les voies métaboliques spécifiques mises en évidence chez certaines espèces de ce genre sont indiquées en vert (flèches et encadrés), les éléments nutritifs moyens (en rose) et les flèches en pointillés indiquent la principale voie de glycolyse de la fermentation primaire...	39
<b>Figure 1.10.</b> Schéma du processus de cavitation acoustique a. inertiel (transitoire) et b. stable adapté de Izadifar, Babyn et Chapman, (2019).....	44
<b>Figure 1.11.</b> Bioréacteurs assistés par US : A. Sonication réalisée avec des transducteurs placés à l'extérieur de la cuve de fermentation ; B. Sonication réalisée à l'aide d'une sonde à US, adaptée de Galv et Carciocchi, (2018).....	45
<b>Figure 1.12.</b> Electroporation des membranes cellulaires exposées aux CEP. Adaptée de (Roohinejad <i>et al.</i> , 2018). ....	51

**Figure 1.13.** Schéma adapté des différents modèles de chambres de traitement statiques et en continu. A. Cellule de traitement conçue par Sensoy, Zhang et Sastry, (1997) B. Dunn et Pearlman, (1987). Cellule de traitement coaxiale C. Pizzichemi, (2007) D. Morshuis *et al.*, (2002). E. Cellule de traitement avec cloisons conçue par Zhang *et al.*, (1995) F. Modèle modulaire par Mastwijk et Bartels, (2000) G. Sale et Hamilton, (1967) H. Pearlman et Diego, (1987) I. Qin *et al.*, (1998) J. Amiali *et al.*, (2004) K. Matsumoto *et al.*, (1991) L. Zhang, Barbosa-Cánovas et Swanson, (1995). .....53

**Figure 1.14.** UFC par millilitre en fonction du temps de traitement par CEP (a) et la consommation d'énergie spécifique W (b) pour différentes intensités de champ électrique ( $E = 0$  à  $2\ 000\ \text{V/cm}$ ) et  $t_r = 24\ \text{h}$ :  $E\ (\text{V/cm}) = 20$  (carré noir),  $100$  (triangle noir),  $1\ 000$  (triangle gris inversé),  $2000$  (losange noir), adaptée de Mattar *et al.*, (2014). .....54

**Figure 2.1.** Aspects morphologiques des deux variétés de pommes étudiées.....61

**Figure 2.2.** Représentation schématique de la mesure de la taille et de la forme des pommes. ....62

**Figure 2.3.** Illustration de la procédure des tests de coupure et de relaxation. ....63

**Figure 2.4.** Schématisation de la cellule de Thoma .....67

**Figure 2.5.** Schématisation de la structure de l'ADNr fongique et des sites des amorces universelles. Les flèches courtes indiquent les amorces universelles. Les barres montrent les fragments d'ADN amplifiés par PCR en utilisant les amorces universelles (adaptée de Horisawa, *et al.*, (2013)) .....69

**Figure 2.6.** Générateur de CEP (400V - 38A).....72

**Figure 2.7.** A. Schéma de la chambre de traitement par CEP conçue, B. Photo réelle de la chambre de traitement par CEP. ....73

**Figure 2.8.** A. Fermentation contrôle en mode batch, sans circulation du milieu, B. Fermentation contrôle en mode batch, avec circulation du milieu (sans traitement CEP). ....74

**Figure 2.9.** A. Schématisation des fermentations assistées par CEP, B. Détails du montage de traitement de la pré-culture par CEP (le générateur CEP non présenté).....74

**Figure 2.10.** Appareil expérimental d'US : A. Générateur et minuteur, B. Cellule de traitement. ....76

**Figure 2.11.** A. Fermentation contrôle en mode batch, B. Fermentation assistée par US et détails de la cellule de traitement par US.....76

**Figure 2.12.** Schematic representation of the apple size and shape determination..... 100

**Figure 2.13.** Schematic representation of the cutting test procedure. .... 101

---

# Sommaire

---

Remerciements.....	1
Résumé.....	3
Abstract.....	3
Valorisation des travaux de recherche .....	4
Nomenclature et abréviations .....	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures .....	7
Sommaire .....	9
<b>Introduction générale .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Revue bibliographique.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. La fermentation.....</b>	<b>18</b>
1.1.1. Définition .....	18
1.1.2. Cinétiques de croissance microbienne .....	18
1.1.3. La fermentation des pommes .....	19
1.1.3.1. Le cidre : Etymologie et Histoire .....	19
1.1.3.2. L'élaboration du cidre .....	20
<b>1.2. Le milieu fermentaire .....</b>	<b>21</b>
1.2.1. Les pommes .....	21
1.2.1.1. La composition biochimique .....	22
1.2.1.1.1. Les sucres .....	22
1.2.1.1.2. Les acides organiques .....	22
1.2.1.1.3. Les composés phénoliques .....	23
1.2.1.1.4. Les lipides.....	24
1.2.1.1.5. Les vitamines .....	24
1.2.1.1.6. Les minéraux .....	24
1.2.2. La pomme libanaise et son potentiel à cidre .....	25
1.2.3. La pomme et le cidre français.....	26
1.2.2. Les facteurs liés au milieu agissant sur la fermentation .....	27
1.2.2.1. Les impacts de la composition physico-chimique des pommes .....	27
1.2.2.2. Les impacts de la composition en sucres du milieu et la disponibilité en oxygène .....	28



1.2.2.2.1. L'effet pasteur.....	29
1.2.2.2.2. L'effet Crabtree .....	29
1.2.2.2.3. L'effet Custer.....	29
<b>1.3. Le ferment : les levures.....</b>	<b>30</b>
1.3.1. La physiologie.....	30
1.3.1.1. La membrane cytoplasmique.....	31
1.3.1.2. Le cytoplasme.....	31
1.3.2. Le cycle cellulaire .....	31
1.3.3. Le métabolisme.....	32
1.3.3.1. La Glycolyse.....	32
1.3.3.2. La respiration.....	33
1.3.3.3. La fermentation alcoolique.....	34
1.3.4. La microflore des pommes.....	35
1.3.5. Les impacts de la levure sur la fermentation .....	35
1.3.6. Les impacts des facteurs extérieurs agissant sur le métabolisme des levures....	39
1.3.6.1. La composition du milieu .....	39
1.3.6.2. La température.....	39
1.3.6.3. Le pH.....	40
1.3.6.4. La concentration des cellules.....	40
1.3.6.5. Le dioxyde de carbone.....	40
1.3.6.6. L'éthanol.....	40
<b>1.4. Le procédé fermentaire : les traitements physiques .....</b>	<b>41</b>
1.4.1. Le stress .....	41
1.4.2. La réponse au stress cellulaire .....	41
1.4.3. Les traitements physiques .....	42
1.4.3.1. Les ultrasons .....	42
1.4.3.1.1. Définition.....	42
1.4.3.1.1.1. Les US de faibles intensités .....	43
1.4.3.1.1.2. Les US de fortes intensités .....	43
1.4.3.1.2. La cavitation .....	43
1.4.3.1.3. L'application des US .....	44
1.4.3.1.3.1. L'application directe .....	44

1.4.3.1.3.2. L'application indirecte .....	45
1.4.3.1.4. Les facteurs agissant sur le traitement par US .....	46
1.4.3.1.4.1. Le seuil de cavitation.....	46
1.4.3.1.4.2. L'intensité et l'amplitude .....	46
1.4.3.1.4.3. La fréquence .....	46
1.4.3.1.4.4. La température et la pression externe.....	46
1.4.3.1.4.5. Les propriétés des milieux de culture.....	47
1.4.3.1.4.6. Les propriétés des microorganismes .....	47
1.4.3.1.5. L'impact des US sur la fermentation .....	48
1.4.3.1.5.1. Impacts sur la fermentation alcoolique .....	48
1.4.3.1.5.2. Impacts sur la fermentation lactique .....	49
1.4.3.2. Les champs électriques pulsés .....	50
1.4.3.2.1. L'électroporation .....	50
1.4.3.2.2. Les sources de courant.....	52
1.4.3.2.3. Les chambres de traitement .....	52
1.4.3.2.4. Les facteurs agissant sur les traitements CEP .....	53
1.4.3.2.4.1. L'intensité des champs électriques appliquée .....	53
1.4.3.2.4.2. Le temps de traitement .....	54
1.4.3.2.4.3. La température du traitement .....	54
1.4.3.2.4.4. La conductivité électrique .....	55
1.4.3.2.4.5. Le type de microorganismes .....	55
1.4.3.2.4.6. La concentration des microorganismes .....	55
1.4.3.2.4.7. La phase de croissance des microorganismes .....	55
1.4.3.2.5. La stimulation des levures .....	56
1.4.3.2.5.1. Les impacts sur la consommation des substrats .....	56
1.4.3.2.5.2. Les impacts sur la croissance cellulaire .....	56
1.4.3.2.5.3. Les impacts sur l'activité fermentaire .....	56
1.4.3.2.6. Les mécanismes cellulaires induits par CEP .....	58
<b>1.5. Conclusions et positionnement du sujet.....</b>	<b>59</b>
<b>2. Matériels et méthodes .....</b>	<b>61</b>
<b>2.1. Les matières premières.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2. Les méthodes analytiques.....</b>	<b>61</b>

2.2.1.	Détermination des propriétés pomologiques des pommes.....	61
2.2.1.1.	Détermination de la masse.....	61
2.2.1.2.	Détermination de la teneur en eau .....	61
2.2.1.3.	Détermination des propriétés de taille et de forme.....	62
2.2.1.4.	Analyses mécaniques.....	63
2.2.1.4.1.	Test de relaxation.....	63
2.2.1.4.2.	Test de coupure.....	63
2.2.2.	Détermination des propriétés biochimiques.....	64
2.2.2.1.	Acidité titrable .....	64
2.2.2.2.	Mesure du pH .....	64
2.2.2.3.	Détermination du °Brix .....	64
2.2.2.4.	Analyse de la teneur en polyphénols .....	64
2.2.2.5.	Détermination du DPPH, activité de piégeage des radicaux libres .....	64
2.2.2.6.	Quantification des sucres.....	65
2.2.2.6.1.	Méthode de séparation par CLHP .....	65
2.2.2.6.2.	Méthode de dosage par kit enzymatique .....	65
2.2.2.7.	Quantification de l'éthanol .....	66
2.2.3.	Détermination de la concentration en biomasse .....	66
2.2.3.1.	Comptage cellulaire.....	66
2.2.3.2.	Turbidité dans le visible .....	68
2.2.4.	Isolement et identification d'une souche de levure.....	68
2.2.4.1.	Isolement à partir du jus de pommes .....	68
2.2.4.2.	Identification de la souche.....	68
2.2.4.2.1.	Caractérisation génétique .....	68
2.2.4.2.2.	Les analyses PCR .....	69
2.2.4.2.3.	Analyse de la séquence d'ADN.....	69
<b>2.3.</b>	<b>Conduite des fermentations</b> .....	<b>70</b>
2.3.1.	Les milieux de fermentation .....	70
2.3.1.1.	Les milieux de culture synthétiques .....	70
2.3.1.2.	Le jus de pommes .....	70
2.3.2.	Culture de <i>Hanseniaspora</i> sp.....	70
<b>2.4.</b>	<b>Calcul des paramètres cinétiques.</b> .....	<b>70</b>

<b>2.5. Les traitements physiques</b> .....	71
2.5.1. Les champs électriques pulsés .....	71
2.5.1.1. Générateur de CEP .....	71
2.5.1.2. La chambre de traitement .....	73
2.5.1.3. Choix du débit et fermentations contrôles .....	73
2.5.1.4. Fermentations assistées par CEP .....	74
2.5.1.5. Calcul des paramètres de traitements par CEP .....	75
2.5.1.5.1. Temps efficace de traitement .....	75
2.5.1.5.2. La consommation électrique spécifique .....	75
2.5.2. Les ultrasons .....	75
2.5.2.1. Le générateur utilisé .....	75
2.5.2.2. La cellule de traitement .....	76
2.5.2.3. Fermentations assistées par US .....	77
2.5.2.4. Calcul des paramètres de traitements par US .....	77
2.5.2.4.1. Temps effectif de traitement .....	77
2.5.2.4.2. La consommation électrique spécifique .....	77
<b>2.6. Les analyses statistiques</b> .....	77
<b>3. Résultats et discussions</b> .....	<b>78</b>
<b>3.1. Etude du potentiel fermentaire des pommes libanaises de la variété « Ace spur ».</b> 78	
3.1.1. Evaluation de la capacité d'élaboration de cidre de la souche indigène <i>Hanseniaspora sp.</i> .....	78
3.1.1.1. Résumé de l'article .....	78
3.1.1.2. Article: Evaluation of the fermentative capacity for cider production by an indigenous <i>Hanseniaspora sp.</i> strain isolated from Lebanese apples .....	79
3.1.2. Etude des propriétés physicochimiques de la variété de pomme libanaise « Ace spur » et évaluation de son potentiel à la production du cidre à l'aide d'une souche de levure <i>Hanseniaspora sp.</i> .....	95
3.1.2.1. Résumé de l'article .....	95
3.1.2.2. Article: Suitability of the Lebanese "Ace spur" apple variety for cider production using <i>Hanseniaspora sp.</i> yeast .....	96
<b>3.2. Etude de l'impact des technologies émergentes (CEP &amp; US) sur les cinétiques       fermentaires.</b> .....	114

3.2.1. Evaluation de l'impact des CEP sur la levure <i>Hanseniaspora</i> sp. au cours de la fermentation du jus de pommes libanaises en vue de l'élaboration du cidre.....	114
3.2.1.1. Fermentation assistée par CEP de la levure <i>Hanseniaspora</i> sp. isolée à partir des pommes libanaises.....	114
3.2.1.1.1. Résumé de l'article .....	114
3.2.1.1.2. Article: Pulsed electric field-assisted fermentation of <i>Hanseniaspora</i> sp. yeast isolated from Lebanese apples.....	115
3.2.1.2. Contrôle du taux de conversion sucre/éthanol lors de la fermentation assistée par CEP d'une souche <i>Hanseniaspora</i> sp. pour la production de cidre à faible teneur en éthanol.....	124
3.2.1.2.1. Résumé de l'article .....	124
3.2.1.2.2. Article: Control of the sugar/ethanol conversion rate during pulsed electric field-assisted fermentation of a <i>Hanseniaspora</i> sp. strain to produce low alcohol cider.....	124
3.2.2. Fermentations assistées par US de la souche <i>Hanseniaspora</i> sp. pour la production de cidre à partir de pommes libanaises.....	132
3.2.2.1. Résumé de l'article .....	132
3.2.2.2. Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples .....	133
<b>4. Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>142</b>
4.1. Conclusion générale.....	142
4.2. Perspectives.....	144
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>146</b>

---

## Introduction générale

---

La fermentation est un procédé de transformation qui précède de loin sa découverte et sa maîtrise par l'Homme. C'est une réaction qui peut se déclencher sans l'intervention humaine, un acte de magie renfermant mille secrets se dévoilant l'un après l'autre au cours de l'Histoire. En 1789, Lavoisier annonce dans son *Traité élémentaire de chimie* ce qui suit « *On voit que, pour arriver à la solution de ces deux questions, il fallait d'abord bien connaître l'analyse et la nature du corps susceptible de fermenter, et les produits de la fermentation ; car rien ne se crée, ni dans les opérations de l'art, ni dans celles de la nature, il y a une égale quantité de matière avant et après l'opération* ». Par la suite, Pasteur arrive à démontrer que **le métabolisme d'un microorganisme est derrière toutes les transformations de la matière** qui ont lieu durant le procédé de fermentation, mais il annonce aussi que « *Le microbe n'est rien, le terrain est tout* ». Dans la première moitié du vingtième siècle, le Professeur Tissot démontre qu'il suffit de **changer quelques paramètres, pour obtenir des transformations réversibles** dans les microorganismes. L'observation microscopique permet de visualiser des dénaturations fragiles des structures internes des bactéries ou des cellules.

Nous déduisons alors que la fermentation a une définition assez large regroupant plusieurs produits finis tels que les boissons alcoolisées. La fermentation alcoolisée est une voie de valorisation et de conservation de plusieurs matières premières engendrant des boissons qui ont su de loin gagner l'amour des consommateurs. Dans cette optique, on pariera sur cette voie de valorisation pour retrouver une solution durable et efficace aux producteurs et agriculteurs de pommes, surtout libanais, qui essaient de contourner plusieurs contraintes aboutissant à l'accumulation de leurs produits. En effet, selon les estimations du Ministère de l'Agriculture libanais qui tiennent compte de l'exportation et du marché local, l'excédent de production annuelle de pommes atteint 30% de la production nationale, ce qui est équivalent à 30 Kt de pommes. Cette production est en pleine expansion au Liban sans toutefois trouver une solution à la surproduction. L'utilisation de cet excédent dans les industries agro-alimentaires reste très limitée, sans aucune valorisation massive des coproduits agricoles. Plusieurs voies de valorisation fermentaire existent tels que la production de cidre, de vins de pommes, du calvados, etc. Le cidre, une boisson conviviale appréciée et consommée couramment partout dans le monde, fera le sujet de nos études.

La fermentation, dans ce cas, appliquée à la transformation des pommes en cidre, nécessite un savoir-faire et une maîtrise de plusieurs paramètres. En premier, d'après les définitions de la fermentation citées ci-dessus, il est clair que la nature de la matière première, connue comme le milieu fermentaire, joue un rôle primordial dans la fermentation. Une composition bien définie des pommes est donc requise pour la production d'un cidre de bonne qualité (Lea Andrew, 2003). En outre, nous déduisons que le ferment et son métabolisme sont un facteur clé à la fermentation. Les producteurs de cidre ou de boissons alcoolisées en général sont à la recherche de nouvelles souches de levures ou à l'utilisation de souche indigène pour produire des boissons « authentiques », diversifiées, et distinctes l'une de l'autre de point de vue saveur, attirant ainsi de plus en plus les consommateurs. Enfin, le procédé de fabrication en telle est un

facteur à prendre en considération aussi. Ainsi, les producteurs tendent à optimiser leur processus de fermentation : le "booster", gagner en productivité, rediriger les voies de production métaboliques cellulaires, etc. Se référer à des souches modifiées génétiquement ne semble plus être une solution. De nos jours, les consommateurs préfèrent tous ce qui est naturel, organique, et authentique. En revenant à la définition de la fermentation, les modifications des conditions de culture pourront avoir ces effets souhaités sur la levure. L'effet des technologies émergentes telles que les champs électriques pulsés (CEP) et les ultrasons (US) sur les microorganismes semble être d'un grand intérêt.

Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont observé des stimulations morphologiques et biochimiques de différents systèmes cellulaires par l'application de faibles intensités de CEP et d'US (Lanchun, Bochu, Liancai, *et al.*, 2003; Beebe et Schoenbach, 2005; Meng, Rouabhia et Zhang, 2011; Mattar *et al.*, 2013). Les résultats des études de stimulation des microorganismes par ces deux technologies sont extrêmement rares dans le secteur alimentaire. De plus, les données de ces études que ce soit relatives aux CEP ou aux US restent controversées en partie à cause des différentes conditions expérimentales telles que les paramètres de traitements, les propriétés des milieux, et le type de microorganisme utilisé.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'Unité de Recherche Technologies et Valorisation Alimentaire (UR-TVA), Centre d'Analyses et de Recherche (CAR), Faculté des Sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ) (Liban), et du Laboratoire Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable (TIMR), Centre de Recherches de Royallieu, Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale / Université de Technologie de Compiègne (UTC) (France).

Ce travail de thèse est soutenu par le conseil de recherche de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth, par le CNRS – Liban, par l'Université de Technologie de Compiègne, et par Campus France. Il vise à valoriser la pomme libanaise en évaluant son potentiel fermentaire pour l'élaboration du cidre. Ainsi, le cœur de nos études était l'étape de la fermentation dans le processus de fabrication. L'analyse de la composition chimique des pommes libanaises « Ace spur » a été effectuée en comparaison avec une pomme à cidre « Kermerrien » utilisée industriellement en France pour la production du cidre. En outre, une souche responsable de la fermentation spontanée de cette variété de pommes a été isolée et identifiée. Son potentiel fermentaire dans les deux variétés de pommes déjà citées a été étudié. Cette étude fournira pour la première fois des données sur la composition chimique de la pomme libanaise, sur une levure présente lors de sa fermentation spontanée, ainsi que sur son potentiel fermentaire.

Dans un second temps, les travaux de thèse se sont focalisés sur l'évaluation de l'impact des procédés émergents de CEP et d'US sur l'activité fermentaire de la levure. Le but de ces études était de montrer la faisabilité d'implémenter ces procédés industriellement. Ainsi, nous proposons une approche de traitement du jus de pommes en continu, une approche qui pourra être transposée de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote, puis industrielle.

Ce travail sera décliné ainsi en quatre chapitres :

Le chapitre 1 « **Revue bibliographique** » rassemblera l'ensemble des informations et des études déjà effectuées qui apporteront des connaissances générales et détaillées sur la

fermentation en l'appliquant dans le but de fermenter le jus de pommes en cidre. Après avoir défini le principe de la fermentation, les paramètres affectant ce procédé seront détaillés en 3 parties différentes : le milieu fermentaire, le ferment, et le procédé, en s'attardant sur les traitements physiques qui pourront assister la fermentation. Il est primordial ainsi d'avoir une idée sur la composition des pommes, la physiologie, le métabolisme de la levure, et enfin l'effet du stress engendré par des traitements physiques.

Le chapitre 2 « **Matériels et méthodes** » présentera le matériel chimique et biologique ainsi que les techniques expérimentales utilisées. Ces techniques seront classées dans ce chapitre relativement à l'enchaînement des résultats dans le chapitre suivant. Les outils mathématiques d'évaluation et de calculs seront de même détaillés.

Le chapitre 3 « **Résultats et discussion** » sera divisé en deux parties. La partie 3.1. présentera l'étude du potentiel fermentaire de la pomme libanaise « Ace spur ». La composition physico-chimique de cette variété sera comparée à celle de la pomme à cidre « Kermerrien », ce qui permettra d'évaluer son potentiel chimique à la production du cidre. Dans un second lieu, le potentiel d'une souche indigène isolée et identifiée de la fermentation spontanée de la variété de pomme libanaise sera étudié dans le jus de pomme libanais et français. La partie 3.2. présentera l'impact des technologies émergentes de CEP et d'US sur la fermentation du jus de pomme avec la souche isolée. L'étude de l'impact des CEP portera d'abord sur la conception d'une cellule de traitement en continu et à l'optimisation des paramètres de traitement dans un milieu synthétique. Les paramètres optimaux déterminés seront par la suite appliqués à la fermentation du jus de pommes. Différentes conditions de traitement ont été testées afin de mieux comprendre l'effet de cette technologie sur l'activité fermentaire de cette levure. Dans le même esprit, l'impact des US sur la fermentation du jus de pommes a été évalué. Une cellule de traitement par US en continu a été conçue. L'optimisation des paramètres de traitement a été d'abord effectuée sur un milieu synthétique, puis appliquée sur le jus de pommes.

Le chapitre 4 « **Conclusion générale et perspectives** » rassemblera les résultats à retenir et la proposition de différentes pistes d'études pour approfondir les connaissances obtenues lors de cette thèse.



---

# 1. Revue bibliographique

---

## 1.1. La fermentation

### 1.1.1. Définition

Depuis le début de l'histoire, l'Homme produisait du pain et des boissons fermentées. Cependant, ce phénomène ne représentait pour lui qu'un simple acte de magie sans toutefois comprendre les mécanismes derrière. Ce n'est qu'au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été bien établi. Anciennement, le terme fermentation (*fervere* du Latin) décrivait le simple phénomène d'ébullition observé suite à l'apparition des bulles de CO<sub>2</sub>. Jusqu'à lors aucune relation entre les levures et la fermentation alcoolique n'a été établie. L'étude chimique de la fermentation a commencée par la suite avec Lavoisier et a été poursuivie par Gay-Lussac dans le siècle suivant. La définition exacte de la fermentation n'a été cependant reçue qu'avec Pasteur qui démontra qu'un microorganisme est responsable des réactions chimiques qui ont lieu durant la fermentation.

La fermentation alcoolique est connue maintenant comme étant un processus enzymatique permettant aux cellules d'obtenir de l'énergie à partir des glucides, même en absence d'oxygène. Elle consiste à transformer des sucres, notamment les hexoses, en éthanol et en CO<sub>2</sub> qui dépendent presque exclusivement de la levure. Ainsi, plusieurs espèces ont été et sont utilisées pour cette fin.

### 1.1.2. Cinétiques de croissance microbienne

La fermentation par lots ou batch est un système de culture fermé contenant une quantité initiale et limitée d'éléments nutritifs. Dans ce système, la culture inoculée passera par différentes phases décrites dans la figure 1.1. Après l'inoculation, aucune croissance ne semble avoir lieu. Cette période est connue comme une phase de latence (Lag phase) ou une période d'adaptation. Dans un processus commercial, il convient de réduire autant que possible la durée de la phase de latence, en utilisant un inoculum approprié et dans des conditions de culture optimales.

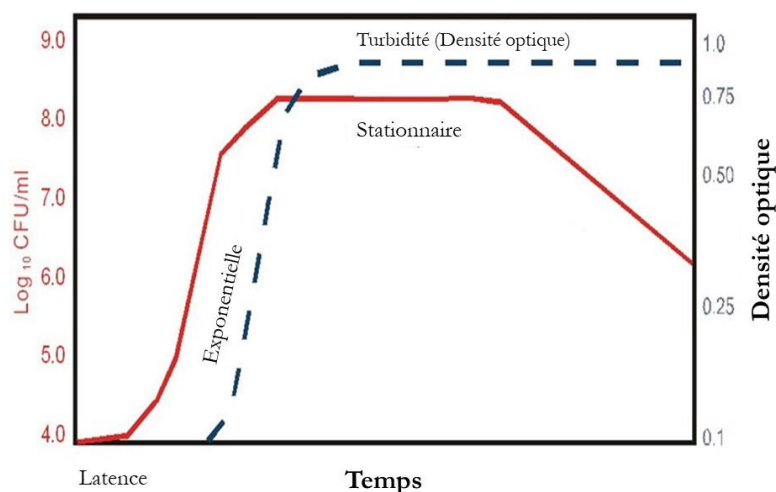


Figure 1.1. Cinétiques de croissance microbienne.

## 1. Revue bibliographique

---

Après une période au cours de laquelle le taux de croissance des cellules augmente progressivement, les cellules se développent à une vitesse maximale, c'est une phase de croissance exponentielle. L'augmentation de la concentration de la biomasse sera proportionnelle à la concentration initiale de la biomasse. Pendant la phase exponentielle, les nutriments sont en excès et l'organisme croît avec un taux de croissance maximal. Cette valeur pourra être affectée par exemple par la composition du milieu, le pH et la température (Stanbury, Whitaker et Hall, 2017).

Nous pourrions prédire que la croissance se poursuivra sans fin. Cependant, la croissance entraîne la consommation de nutriments et l'excrétion de produits microbiens. Ces événements influenceront la croissance de l'organisme. Ainsi, après un certain temps, le taux de croissance diminue jusqu'à ce que la croissance s'arrête. Cet arrêt peut être dû à l'épuisement de certains nutriments essentiels, à l'accumulation de certains produits toxiques de l'organisme dans le milieu, ou à une combinaison des deux faits. La croissance de la levure pourra être freinée aussi par le taux d'alcool, la concentration élevée de cellules, et bien d'autres paramètres.

Les différents produits de la fermentation permettent de classer les réactions fermentaires en plusieurs types comme la fermentation alcoolique, lactique, acétique, butyrique, et acétonobutylique. Cependant, la fermentation alcoolique est la plus anciennement étudiée, l'Homme savait que laisser longtemps des fruits et des céréales dans des récipients fermés produisait du vin et de la bière. Ainsi, la fermentation alcoolique paraît représenter une voie de valorisation des fruits. Un fruit bien particulier a su une richesse symbolique unique au cours du temps. La pomme, le fruit d'Adam et Eve, est produit actuellement massivement dans le monde. Spécifiquement, au Liban, la production de pomme est en expansion mais une grande quantité de pommes reste en excès. Différentes voies de valorisation et de transformation des pommes existent telles que par exemple la production de vinaigre, de vins de pommes, et de cidre. Une ligne directrice clé rejoint ces trois voies de valorisation : la fermentation. Quoique la pomme soit la même, différents types de produits peuvent être élaborés selon la voie fermentaire adoptée et le procédé de fabrication. La production de vinaigre et l'élaboration du vin de pommes sont des voies déjà présentes au Liban alors que la production du cidre reste une voie de valorisation très peu exploitée localement.

### 1.1.3. La fermentation des pommes

Les travaux de cette thèse se focaliseront sur l'étape de fermentation des pommes, et principalement dans le processus de l'élaboration du cidre. Il sera alors intéressant de détailler par la suite le cidre et son processus de fabrication.

#### 1.1.3.1. Le cidre : Etymologie et Histoire

Le mot « cidre » est dérivé des sources grecques *sikera* et signifie simplement « boisson forte », bien qu'un millénaire d'utilisation le lie maintenant avec les pommes. A l'époque, le cidre est connu comme étant une boisson faite « entièrement ou partiellement à partir du jus de pommes fermenté ». De nombreux documents tout au long de l'histoire font référence au cidre et aux vergers de pommiers. Actuellement, la plupart du cidre commercial est élaboré au Royaume-Uni (environ 400000 m<sup>3</sup> par an), suivi par la France (environ 110000 m<sup>3</sup> par an),

## 1. Revue bibliographique

---

l'Irlande, l'Espagne, l'Allemagne, et la Suisse. Sa production dans d'autres pays est extrêmement faible. Bien qu'il semble avoir été fait dans le bassin méditerranéen à l'époque de Pline (1<sup>er</sup> siècle après JC), il est devenu bien établi en Normandie et en Bretagne au début de l'époque médiévale (à partir de 800 après JC). Peu de temps après, il semble s'être emparé en Grande-Bretagne, et la première mention de la production établie dans ce pays est de 1205. Le cidre a été une tradition américaine depuis les jours du May Flower. Cette boisson a été apportée par les passagers de l'Europe. En 1638, des tonneaux de cidre ont été renfermés dans les caves des fermes de la Nouvelle - Angleterre. Entre 1870 et 1892, le cidre devient la boisson la plus populaire en Amérique avec une augmentation de la consommation de 200%.

### 1.1.3.2. L'élaboration du cidre

Différents types de cidre existent sur le marché, toutefois comme la Grande Bretagne et la France sont connues par leur propre spécialité à produire des cidres traditionnels. Le cidre français est souvent produit suivant un processus naturel sans additifs et d'autres traitements modernes, comparé avec le cidre anglais. Due aux différentes méthodes de production, le cidre français tend à être fruité alors que le cidre anglais est plus riche en alcool.

La classification basique du cidre est comme doux, sec (ou brut), pétillant, champagne, ou carbonaté. Le cidre sec est fermenté jusqu'à la consommation totale des sucres, sa teneur en alcool varie de 6 à 7%, dépendamment de la concentration initiale en sucre.

Plusieurs facteurs influencent l'élaboration du cidre tels que les variétés de pommes utilisées, l'acidité du jus, le ferment utilisé, la nature de l'équipement et sa capacité de production, l'utilisation d'édulcorants ou d'additifs chimiques, et enfin, les goûts et les préférences des buveurs de cidre régionaux. Pourtant, tout processus de production de cidre passe par trois étapes simples. En automne, le fruit mûr est écrasé puis le jus en est extrait. Il peut être fermenté pendant des semaines ou des mois, mais généralement en fin d'hiver, le cidre fini est mis en bouteille. Les pommes subiront plusieurs traitements et transformations avant de donner du cidre. Ces étapes sont résumées dans le schéma qui suit (**Figure 1.2**), et nous développerons par la suite l'étape de la fermentation où nous focaliserons nos études.

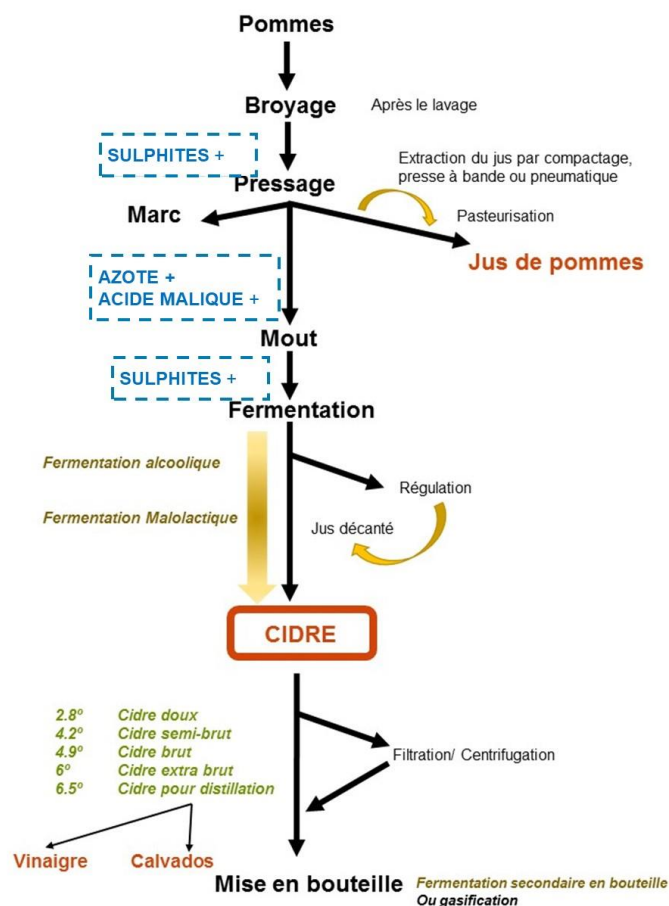


Figure 1.2. Schéma récapitulatif de l'élaboration du cidre.

Les travaux de cette thèse s'intéressent à l'étape clé de ce processus : la fermentation. La maîtrise de la fermentation nécessite la maîtrise de trois paramètres importants liés au milieu de fermentation, au ferment, et au procédé utilisé lors de la fermentation. Ces trois paramètres feront la base de nos études, il paraît alors primordial de décrire dans ce qui suit chacun d'eux. En premier, les pommes dans notre cas représentent la matière première nécessaire à la production de ce produit fermenté, en d'autres termes le milieu fermentaire. Ainsi, une compréhension de cette matière produite mondialement, tellement diversifiée et vaste sera une première étape primordiale.

## 1.2. Le milieu fermentaire

### 1.2.1. Les pommes

La pomme (*Malus domestica*) appartient à la sous-famille « *Maloideae* » et à la famille des « *Rosaceae* ». Elle représente l'un des plus importants fruits d'arbres à feuilles caduques. Les pommiers sont généralement cultivés dans les régions tempérées et tropicales entre les latitudes 30° et 60° Nord, et 25° et 45° Sud (Ferree et Warrington, 2015). La pomme est l'un des fruits les plus produits et consommés mondialement. En effet, la pomme est le troisième fruit produit dans le monde avec une production mondiale atteignant 77 millions de tonnes métriques en 2016/2017 (USAD, 2018). La Chine, produisant près de 43,5 millions de tonnes

## 1. Revue bibliographique

par an, représente le plus grand producteur de pommes mondial, suivie par les États-Unis et l'Union Européenne.

### 1.2.1.1. La composition biochimique

Les pommes mûres sont principalement composées d'environ 85% d'eau, 12 à 14% de glucides, 0,3 à 1% d'acide organique, 0,3% de protéines, et moins de 0,1% de lipides, de minéraux, et de vitamines (Nacional et Alimentación, 2009). Cette composition biochimique est principalement liée à la variété, la maturité, et aux conditions agronomiques et climatiques. Considérons ainsi dans ce qui suit chaque composé seul.

#### 1.2.1.1.1. Les sucres

Trois groupes de sucres existent : les monosaccharides, les oligosaccharides, et les polysaccharides. Les deux principaux monosaccharides des pommes sont le glucose et le fructose. Le saccharose est le disaccharide essentiel dans les pommes, vu que les autres oligosaccharides n'ont aucune importance quantitative (Tableau 1.1). Le D-sorbitol, sous forme de sucre alcool, est abondant dans les pommes avec une concentration de 300 à 800 mg/100 mL de jus de pomme (Belitz et Grosch, 2009). Les polysaccharides comportent de la cellulose, de l'hémicellulose, et des pectines.

**Tableau 1.1. Teneur en sucres simples et pariétaux des pommes (Belitz et al., 2009; Renard et al., 2001).**

	Concentration*		Concentration**
<b>Glucose</b>	1.8	<b>Arabinose</b>	109
<b>Fructose</b>	5.6	<b>Rhamnose</b>	12
<b>Saccharose</b>	2.6	<b>Fucose</b>	8.5
		<b>Galactose</b>	71.5
		<b>Glucose</b>	288
		<b>Mannose</b>	21
		<b>Xylose</b>	57
		<b>Acide</b>	227
		<b>Galacturonique</b>	

\*g/100g du produit frais

\*\*mg/g de paroi cellulaire

#### 1.2.1.1.2. Les acides organiques

L'acide L-malique est le principal acide organique présent dans les pommes. L'acide citrique est trouvé à des concentrations très faibles, atteignant des concentrations inférieures de milles fois celle de l'acide malique. La pomme contient au moins neuf à douze acides en petites fractions. L'acidité des pommes peut varier de 0,1 à 2,5 g d'acide malique pour 100 g de jus (Valois, Merwin et Padilla-Zakour, 2006). Outre l'acide malique, des acides citrique, succinique, citramalique, shikimique, glycérique, glyoxylique, isocitrique, glycolique, lactique, et galacturonique sont présents dans le jus de pommes. Trois cétoacides différents ont été trouvés : l'acide oxaloacétique, l'acide pyruvique et l'acide cétoglutarique. Cependant, ces acides ne représentent qu'une petite fraction des acides organiques totaux présents.

## 1. Revue bibliographique

### 1.2.1.1.3. Les composés phénoliques

La mesure des substances phénoliques présentes dans le fruit a été d'un grand intérêt pour les pomologues et les producteurs de cidre. Les composés phénoliques, métabolites secondaires des plantes, jouent un rôle majeur dans la qualité sensorielle et nutritionnelle du fruit. Structuellement, les polyphénols sont tous composés d'un ou plusieurs cycles aromatiques de structures différentes permettant leur classification en catégories (**Figure 1.3**). Les composés phénoliques se distinguent par le nombre et la séquence des cycles aromatiques, le nombre et la position des groupes hydroxyle ainsi que par la présence de substitués non phénoliques tels que les groupes alkyles, les sucres, et les acides organiques.

Les polyphénols présents dans les pommes appartiennent à deux catégories : les acides phénoliques et les flavonoïdes. L'acide caféoylquinique est présent à des concentrations relativement élevées dans la peau et la chair de la plupart des variétés de pomme. L'oxydation de l'acide chlorogénique, désignant l'acide 5'-caféoylquinique, est principalement responsable du brunissement du jus de pomme et du cidre (Nicolas *et al.*, 1994). D'autre part, les anthocyanidines, le flavanol (également appelé flavan-3-ols), les flavonols (principalement les glycosides de quercétine) et les dihydrochalcones constituent les principaux sous-groupes de flavonoïdes (Guyot *et al.*, 1998; Chinnici *et al.*, 2004). Les monomères flavan-3-ols constituent la deuxième classe de polyphénols dans les pommes après les acides hydroxycinnamiques. Ils ne sont représentés que par la (+) - catéchine (CAT) et la (-) - épicatechine (EC). La (-) - épicatechine est principalement prédominante avec des concentrations allant de 46 mg/kg à 2225 mg/kg. D'autre part, la (+) - catéchine est le composé le moins important des flavanols avec des concentrations allant de 6 mg/kg à 408 mg/kg (Guyot *et al.*, 1998).

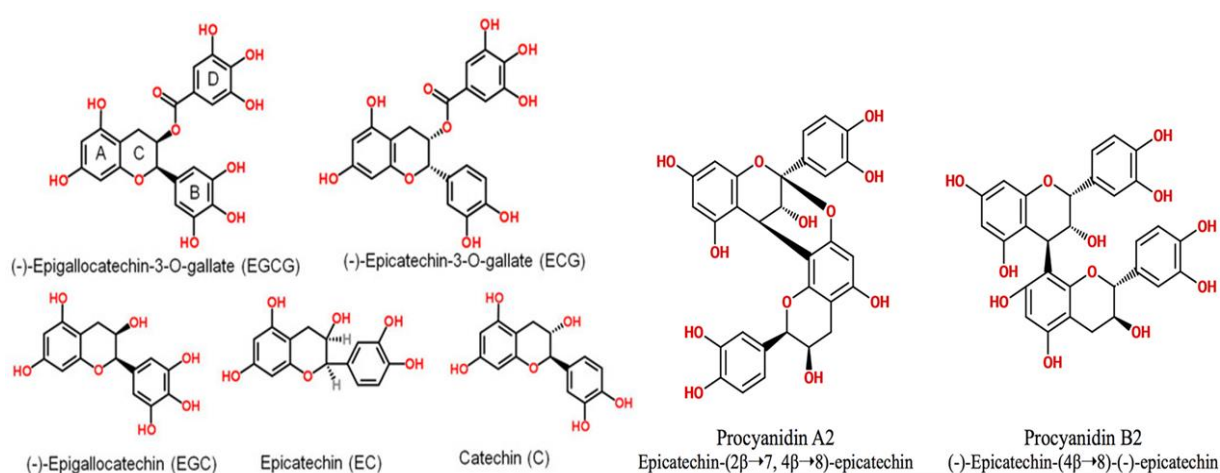


Figure 1.3. Structures de différentes formes de catéchines et proanthocyanidines (Xu, Xu et Zheng, 2017).

La quercétine, un antioxydant efficace, est présente à des concentrations élevées de 49 mg/kg de pommes (Belitz et Grosch, 2009). Enfin, les dihydrochalcones représentent une classe spécifique de flavonoïdes présents dans les pommes. Des quantités de plus de 3 g/kg y sont présentes, ce qui est équivalent à 66% des composés phénoliques présents (Guyot *et al.*, 1998).

## 1. Revue bibliographique

---

### 1.2.1.1.4. Les lipides

Les fruits ont généralement une faible teneur en lipides, environ 0,1 à 0,5% du poids frais. Des niveaux élevés de lipides sont généralement détectés dans les graines de fruits. Les triacylglycérols, les glyco et phospholipides, les caroténoïdes, les triterpénoïdes et les cires constituent la fraction lipidique dans les fruits (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2. Pourcentage de lipides dans les pommes (Belitz et Grosch, 2009).**

	% de lipides totaux
<b>Triacylglycérols</b>	5
<b>Glycolipides</b>	17
<b>Phospholipides</b>	47
<b>Stérols</b>	15
<b>Stérol esters</b>	2
<b>Sulpholipides</b>	1
<b>Autres</b>	13

### 1.2.1.1.5. Les vitamines

La vitamine C est biosynthétisée dans les plantes à partir d'hexoses tels que le glucose. La teneur en vitamine C, également appelée acide L-ascorbique, est comprise entre 3 et 35 g/100 g de portion comestible de pomme. Les vitamines B12 et D et les tocophérols ne se trouvent qu'en traces (Belitz et Grosch, 2009).

### 1.2.1.1.6. Les minéraux

Les minéraux appelés nutriments inorganiques se retrouvent dans tous les fruits. Le cation et l'anion les plus importants sont respectivement le potassium et le phosphore. D'autres éléments comme le sodium, le calcium et le fer sont aussi présents à des concentrations moindres (Tableau 1.3).



## 1. Revue bibliographique

Tableau 1.3. Concentrations des minéraux dans les pommes (Belitz et Grosch, 2009)

	mg/100g matière sèche		mg/100 g matière sèche
<b>Potassium</b>	840	<b>Fer</b>	1,6
<b>Sodium</b>	7,9	<b>Aluminium</b>	0,43
<b>Calcium</b>	38	<b>Phosphore</b>	73
<b>Magnésium</b>	40	<b>Zinc</b>	0,65
<b>Manganèse</b>	0,3	<b>Copper</b>	0,35

### 1.2.2. La pomme libanaise et son potentiel à cidre

Environ 13 500 ha de terres au Liban sont dédiés à la culture des pommes. Cependant, la majorité des terres cultivées sont inférieures à un hectare. Les principales régions productrices de pommes sont : le Liban-Nord, le Mont-Liban, la Beqaa, et le Liban-Sud. La région du Nord seule produit 45% de la production nationale, en particulier les zones autour de Fneideq, Akkar el Aatiqa, et Tannourine. Au Mont Liban cette concentration atteint 35%, alors qu'elle n'est que de 12% au centre et au nord de la vallée de Bekaa.

La production de pommes libanaises a vu une augmentation avec le temps, elle a atteint les 264 000 tonnes en 2012. Environ 10 à 15% des pommes sont de premier choix de qualité, et sont consommées par les Libanais qui les achètent aux prix les plus élevés. Les pommes de moindre qualité sont exportées principalement vers l'Égypte.

Les variétés de pommes traditionnelles produites au Liban sont des dérivés de variétés introduites par des Moines Jésuites dans les années 1800, ainsi que par les immigrants libanais rentrant chez eux après la Seconde Guerre mondiale. Ils incluent principalement les variantes de la peau rouge de Red Delicious (Starking, Double-Red), et Golden Delicious avec Sans Pareil (Mowachah). Ces pommes traditionnelles ont permis au Liban d'être l'un des plus importants producteurs de pommes dans la région.

Les exportations de pommes ont diminué depuis 2012, alors que les importations ont connu une augmentation au cours de la même période. Ainsi, les quantités entrantes de pommes demeurent plus élevées que celles sortantes du pays. En revanche, la valeur des importations de pommes a augmenté avec un taux de 17,25 % pour atteindre 1 692 tonnes avec une valeur de 1,43 M\$ en 2015 (**Figure 1.4**). Au cours des trois premiers trimestres de 2016, le Liban a enregistré une baisse annuelle de 34,96 % des exportations de pommes. Les exportations ont été limitées à 33 754 tonnes, avec une baisse de 13,61 % sur un an à 8,10 M\$. L'Égypte était la principale destination, 73,09 % des exportations des pommes libanaises, suivi par le Koweït avec une participation de 9,13 %, tandis que l'Arabie saoudite absorbe 9,05 % des exportations de pommes libanaises.



## 1. Revue bibliographique

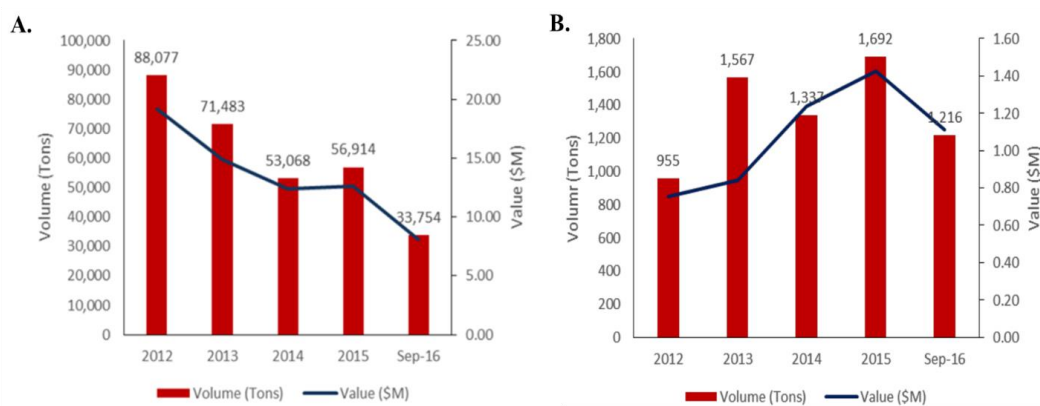


Figure 1.4. A. Représentation du volume et des valeurs de l'exportation, et B. de l'importation des pommes au Liban de 2012 jusqu'en 2016 (Saadeh, 2016).

Malgré ces statistiques, aucune donnée n'a été retrouvée sur la composition de la pomme libanaise, de la flore microbienne, et sur les capacités de fermentation du jus de pomme (*Pome fruit value chain assessment report.*, 2014). Également, aucune donnée n'existe sur le pourcentage de pommes transformées industriellement ou sur le potentiel de transformation de la pomme libanaise en un produit spécifique.

### 1.2.3. La pomme et le cidre français

La pomme est sans doute le fruit le plus consommé par les Français. Elle représente 19,5% du marché des fruits, devançant la banane avec 13,3% des parts du marché suivi de l'orange avec 13,2% (Agreste Panorama, 2017). La France se positionne comme étant le 3<sup>ème</sup> pays producteur de pommes en Europe, derrière la Pologne et l'Italie (Eurostat, 2015). Environ 50% des pommes produites en France sont destinées au marché français, 38% à l'exportation et le reste sera dédié à la transformation (Agreste Panorama, 2017).

La pomme est récoltée quasiment tout au long de l'année, d'août jusqu'en juin. Plusieurs variétés de pommes sont produites par an avec des proportions différentes. La variété principale produite est la « Golden » (575 000 tonnes), suivie par la « Gala » (263 000 tonnes), puis la « Granny Smith » (192 000 tonnes). 8 000 exploitations de pomicultures sont présentes en France. Elles sont étendues sur 45 000 hectares de vergers, majoritairement situés dans la vallée de la Loire, le Sud-Ouest, Languedoc-Roussillon, Provence et vallée du Rhône (Fédération Nationale des Producteurs de Fruits (FNPF), Section Nationale de la Pomme (Association Nationale). Des variétés spécifiques de pommes à cidre sont cultivées et dédiées spécifiquement à l'élaboration du cidre.

Au niveau des transformateurs, le marché du cidre se structure entre coopératives, artisans et producteurs fermiers. Ces cidreries artisanales et fermières contribuent à donner au marché des angles divergents, de diversité et de proximité. Le cidre est un produit de dégustation et aussi de convivialité, à faible teneur en alcool (2 % à 6 %). Sa consommation reste limitée ne dépassant pas en France un million d'hectolitres par an, soit deux bouteilles par adulte et par an. En se basant sur leur composition chimique, les différentes variétés de pommes à cidre seront divisées en plusieurs catégories, comme présenté sur le tableau 1.4 (Institut français des productions cidricoles, 2009).

## 1. Revue bibliographique

**Tableau 1.4. Classification des variétés des pommes à cidre en fonction de leurs caractéristiques gustatives.**

Amère	Douce-amère	Douce	Acidulée
C'Huero Briz, Chevalier Jaune, Cidor, Domaines, Doux Joseph, Fréquin Rouge Petit, Jeanne Renard, Kermerrien, Marie Ménard, Marin Onfroy, Meriennet, Mettais, Petit Amer, Tardive de la Sarthe.	Antoinette, Argile Rouge Bruyère Bedan, Binet Blanc, Binet Rouge, Binet Violet, Bisquet, C'Huero Ru Cartigny, Clos Renaux, Clozette Douce, Douce Moen, Doux Lozon, Gros Bois, Gros Œillet, Moulin à Vent, Muscadet de Dieppe, Noël des Champs, Omont, Peau de Chien, Saint Martin.	Belle Fille de la Manche, Douce Coetligné, Doux au Gober, Doux Evêque Jaune, Doux Normandie, Doux Veret de Carrouges, Muscadet Petit de l'Orne, Queue Torte, Rouge Duret, Rousse de la Sarthe.	Blanchet, Guillevic, Judeline, Locard Blanc, Pomme de Moi, Rouget de Dol Gros Sebin Blanc, Tesnière.

Nous nous intéresserons à développer les spécificités de la variété « Kermerrien » (**Figure 1.5**), vu qu'elle sera utilisée durant les travaux de cette thèse. La productivité de cette variété est de 35-40 tonnes/ha en France. C'est une variété amère, à maturité fin septembre début octobre et de bonne productivité. Elle peut être implantée dans des sols moyennement fertiles. Elle se caractérise par une forme conique, et une couleur verte à rouge. La saveur du moût en dérivant est plutôt douce-amère et légèrement parfumée, engendrant ainsi un cidre amer ([Institut français des productions cidricoles, 2009](#)).



**Figure 1.5. Photo de différents angles de la variété de pommes "Kermerrien".**

La popularité du cidre provient de la facilité de production de cette boisson. Bien qu'il existe des aspects techniques et des préférences personnelles, la pomme demeure l'élément essentiel à la production du cidre. Les styles et les méthodes de production sont aujourd'hui aussi nombreux que les variétés de pommes eux-mêmes.

### 1.2.2. Les facteurs liés au milieu agissant sur la fermentation

#### 1.2.2.1. Les impacts de la composition physico-chimique des pommes

La fermentation des pommes dépend principalement de trois composés : les sucres, les acides organiques, et les composés phénoliques. Ainsi, le choix des pommes pour la production du cidre aura un impact sur la qualité du produit fini. Dans les pays ayant d'anciennes traditions en cidre, des variétés spéciales de pommes sont cultivées pour avoir des teneurs en acides et en composés phénoliques plus élevées que celle des pommes de table. Cependant, l'utilisation des pommes de table devient de plus en plus fréquente surtout en Allemagne, la Suisse, et l'Amérique. Ainsi, afin d'aider les producteurs de cidres à obtenir un mélange optimal et des ratios d'acidité, de polyphénols, et des alcools dérivés de sucres ou des sucres résiduels dans

## 1. Revue bibliographique

---

leur produits, un système de classification quantitative a été développé par Long Ashton Cider Research station au Royaume-Uni. Chaque pomme peut être classée dans une des quatre catégories basées sur ces critères (Lea Andrew, 2003) :

1. Douce-amère : riche en tanin et acidité faible
2. Acide-amère : riche en composés phénoliques, acidité élevée
3. Acide : faible en composés phénoliques, acidité élevée
4. Douce : faible en composés phénoliques et en acidité.

Les composés phénoliques ont un effet important sur les propriétés sensorielles du cidre comme la couleur, l'amertume, et l'astringence. Le profil phénolique peut différer d'une variété de pomme à une autre, mais il peut également dépendre de l'année de récolte, des changements climatiques, ainsi que des conditions de culture et de stockage (Mangas *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2008). Les procyanidines, composés de poids moléculaire élevés, jouent un rôle majeur dans l'astringence, tandis que les molécules de plus faible poids sont responsables du goût amer. De plus, les polyphénols peuvent influencer sur le goût sucré et l'acidité, ayant ainsi un effet sur le développement général des arômes pendant la fermentation (Park, 2014; Symoneaux *et al.*, 2014). Non seulement les composés phénoliques non volatils ont un rôle majeur pendant la fermentation, mais également les composés phénoliques volatils formés par des réactions enzymatiques au cours de la fermentation contribuent à la formation des arômes du produit final.

Un autre facteur à prendre en compte est la composition et la concentration en sucres initiales. La concentration en glucose et en fructose peut influencer la croissance de la levure ; une concentration élevée en sucre diminuera le taux de croissance de certaines souches de levures (paragraphe 1.2.2.2). Pour des concentrations de sucre comprises entre 200 et 300 g/L, une diminution du taux de croissance de *S. cerevisiae* a été observée (Charoenghai, Fleet et Henschke, 1998; D'Amato *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2009). En effet, une concentration élevée en sucre augmente la demande de la levure en azote assimilable, ce qui peut également provoquer l'inhibition de la fermentation (Boudreau *et al.*, 2018). La nature du sucre peut également affecter le processus de fermentation. Les monosaccharides peuvent produire du dioxyde de carbone plus rapidement que les disaccharides.

En outre, de nombreux autres facteurs peuvent jouer un rôle dans la progression de la fermentation. Certaines variables, telles que la température et le pH, peuvent influencer le taux de croissance de la levure et sur l'écologie et l'adaptation des levures présentes (Charoenghai, Fleet et Henschke, 1998; Arroyo-López *et al.*, 2009).

### 1.2.2.2. Les impacts de la composition en sucres du milieu et la disponibilité en oxygène

La composition en sucres du milieu et la disponibilité en oxygène représentent les deux principaux composants ayant un impact important sur la physiologie métabolique des levures.

Trois effets fréquemment observés sont associés aux types de processus de génération d'énergie impliqués dans le métabolisme du sucre et/ou par la disponibilité en oxygène qui sont

## 1. Revue bibliographique

---

les effets : Pasteur, Crabtree, et Custer (Rodrigues, Fernando Ludovico, Paula Leao, 2005; Concetta Compagno, Sofia Dahko, 2014).

### 1.2.2.2.1. L'effet Pasteur

Pasteur a été le premier à comparer la croissance des levures dans des conditions aérobiques et anaérobiques. Pour des faibles concentrations de glucose, les levures utilisent les sucres soit par respiration, soit par fermentation. L'aération induit une augmentation de la biomasse formée (totale et par unité de sucre dégradé), et en parallèle une diminution de la production d'alcool et de la consommation de sucre. Pasteur retient alors que la respiration inhibe la fermentation. Le fait que deux enzymes (pyruvate décarboxylase et pyruvate déshydrogénase) sont en compétition pour catalyser la respiration ou la fermentation du pyruvate pourra expliquer cette inhibition. La pyruvate décarboxylase est impliquée dans la voie fermentaire. Elle se caractérise par une faible affinité pour le pyruvate contrairement à l'enzyme pyruvate déshydrogénase. De plus, la phosphorylation oxydative consomme beaucoup d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique, qui migrent vers les mitochondries. Il en résulte une carence en ADP et en phosphate inorganique dans le cytoplasme. Ce déficit peut limiter la phosphorylation et ralentir ainsi le flux glycolytique. L'inhibition des enzymes de la glycolyse par l'adénosine triphosphate (ATP) explique en grande partie l'effet Pasteur.

### 1.2.2.2.2. L'effet Crabtree

Dans des milieux contenant de fortes concentrations de glucose, tel que le cas dans le moût de raisin, *S. cerevisiae* ne métabolise les sucres que par voie fermentaire. Même en présence d'oxygène, la respiration est impossible. Cet effet a été découvert par Crabtree, (1929) sur des cellules tumorales, et il est reconnu sous plusieurs appellations : répression catabolique par le glucose, effet contraire Pasteur, et effet Crabtree. Les levures manifestent les signes suivants lors de cet effet : dégénérescence des mitochondries, diminution de la proportion de stérols cellulaires et d'acides gras et répression de la synthèse des enzymes mitochondriales du cycle de Krebs et des constituants de la chaîne respiratoire.

L'effet Crabtree a été divisé en effets à court et à long terme, principalement basés sur des études de culture continues où, dans des conditions d'équilibre, le taux de croissance peut être manipulé de manière expérimentale (Petrik, Kappeli et Fiechter, 1983). L'effet à court terme est défini comme la capacité à déclencher la fermentation alcoolique en cas d'excès soudain de glucose, tandis que l'effet à long terme est caractérisé par le métabolisme fermentatif respiratoire observé spécifiquement avec des cultures discontinues.

### 1.2.2.2.3. L'effet Custer

L'effet Custer est connu comme étant l'inhibition de la fermentation alcoolique en absence d'oxygène. Cet effet caractérise les levures appartenant aux genres *Brettanomyces* et *Dekkera* qui fermentent le glucose en éthanol et en acide acétique dans des conditions aérobiques (Wijsman *et al.*, 1984; van Dijken *et al.*, 1986). Cependant, lors du passage aux conditions anaérobiques, la fermentation est alors fortement inhibée. Ce phénotype peut être entièrement sauvé par la réintroduction d'oxygène dans le milieu de culture ou par l'addition d'accepteurs de H<sup>+</sup> tels que l'acétoïne (réduite en 2,3-butanediol) ou d'autres composés carbonylés

## 1. Revue bibliographique

aliphatiques (Scheffers, 1966; Wijsman *et al.*, 1984). Cet effet peut être provoqué par un stress réducteur. Il semble que les levures présentant cet effet soient en quelque sorte incapables d'établir la balance redox par la production de glycérol ou d'autres composés fortement réduits.

Après avoir détaillé le premier paramètre essentiel à la maîtrise de la fermentation, la partie qui suit présentera le second paramètre relatif au ferment utilisé lors de ce procédé. Il semble alors essentiel de comprendre la physiologie, le métabolisme, et les facteurs agissants sur la levure pour pouvoir maîtriser et améliorer ce phénomène.

### 1.3. Le ferment : les levures

#### 1.3.1. La physiologie

Les levures appartiennent au groupe de champignons unicellulaires qui se reproduisent par bourgeonnement ou fission binaire. Trois classes en existent selon le mode de reproduction : les ascomycètes, les basidiomycètes, et les deutéromycètes. Les levures représentent les eucaryotes les plus simples vu leur composition cellulaire. Elles sont constituées d'enveloppes cellulaires, d'un cytoplasme contenant divers organites, et d'un noyau renfermant les chromosomes, schématisées par la figure 1.6. Dans ce qui suit nous considérons chacun de ces composants.

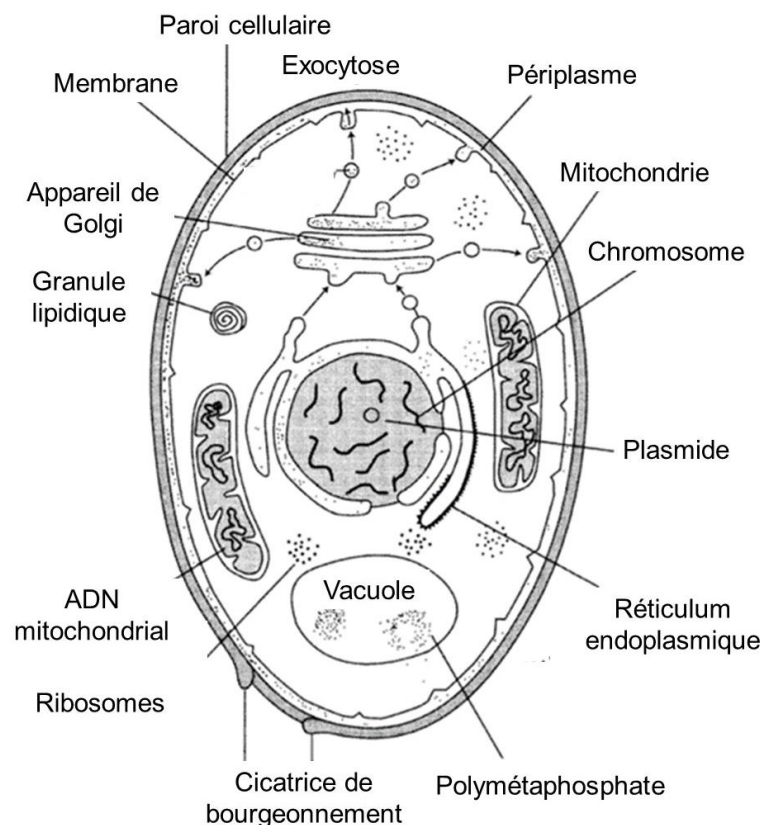


Figure 1.6. Schéma d'une cellule de levure adapté de Gaillardin et Heslot, (1987).

La paroi cellulaire est composée de polysaccharides tels que des glucanes, des polymères du glucose, des mannanes, et des polymères de mannose. Vu sa structure rigide, le rôle de la paroi cellulaire est principalement de protéger la cellule et de maintenir leur forme. D'un côté,



## 1. Revue bibliographique

---

les glucanes forment un réseau de fibrilles maintenu par des liaisons covalentes et des liaisons hydrogène, et d'un autre côté, les mannanes et les complexes mannanes-protéines de haut poids moléculaires insolubles forment la couche la plus externe. Cependant, la paroi cellulaire garde une certaine élasticité lui permettant de varier son volume cellulaire pour réagir à la pression osmotique engendrée par les variations des conditions environnementales.

### 1.3.1.1. La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique, principalement composée de lipides (triglycérides, phospholipides, et stérols), de protéines, et de lipoprotéines, présente une structure bicouche caractérisée par un arrangement des molécules de phospholipides côte à côte et dos à dos, avec leurs groupes polaires vers l'extérieur. Une intercalation des protéines est observée au niveau de cette structure bicouche. Le rôle de la membrane est essentiel pour le métabolisme de la levure. Ses trois fonctions principales sont les suivantes : former une barrière extensible permettant à la cellule de se gonfler ou de se contracter en fonction des concentrations externes, contrôler l'entrée ou la sortie des solutés par simple diffusion ou par transport actif à travers de nombreuses enzymes, et servir de base pour la fixation des composants de la paroi cellulaire.

### 1.3.1.2. Le cytoplasme

Le cytoplasme est un fluide colloïdal dans lequel se déroule une série de réactions biochimiques. Il contient de nombreux organites, nous en citons les principaux :

- Le réticulum endoplasmique et le réseau de membranes de l'appareil de Golgi impliqués dans la sécrétion de protéines ;
- Le noyau contenant 16 chromosomes haploïdes ;
- Les vacuoles, organites clés impliqués dans le trafic de protéines, jouent le rôle de lysosomes en stockant des enzymes inactives (e.g. protéases, nucléases, estérases, etc.) capables d'hydrolyser certaines macromolécules. Ces enzymes deviennent notamment actives lors de la lyse cellulaire ;
- Les mitochondries sont des structures sphériques ou en bâtonnets, larges de 0,3 à 1 micron et peuvent atteindre 3 microns de long, entourées d'une double membrane. Elles présentent le site de la respiration, équipé d'enzymes capables d'oxyder divers substrats avec des systèmes de transport d'électrons ainsi que des enzymes qui convertissent l'énergie libre des réactions d'oxydation en ATP ;
- Les ribosomes, site de synthèse protéique, sont des particules composées de deux sous-unités (40 S et 60 S).

### 1.3.2. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire de la levure peut être déterminé par le nombre de divisions effectuées. Prenons l'exemple de *S. cerevisiae* qui se reproduit de manière asexuée par bourgeonnement. À la suite de ce processus, la cellule mère porte une cicatrice de chitine au point de duplication (Araújo *et al.*, 2007). Le bourgeonnement étant asymétrique engendre une cellule fille plus petite que la cellule mère, dépendamment des conditions de croissance.

## 1. Revue bibliographique

---

Le cycle cellulaire est constitué de plusieurs étapes. Le stade zéro (G0) est la phase de repos (la cellule a quitté le cycle, pas de division). Ensuite, pendant l'interphase, la cellule passe par quatre phases : la première phase est l'intervalle 1 (G1), au cours duquel la taille des cellules augmente. C'est une étape de contrôle afin de s'assurer que la cellule est prête pour la synthèse de l'ADN. La synthèse S n'est que la deuxième phase où la réplication de l'ADN aura lieu. La troisième phase est l'intervalle 2 (G2) durant laquelle la cellule continuera à se développer. Un point de contrôle G2 garantira l'aptitude de la cellule à passer à une quatrième phase M (mitose) et à se diviser. Par la suite, au milieu de la mitose un autre point de contrôle (métaphase checkpoint) assure que la cellule est prête à terminer la division cellulaire. Les cellules filles ne pourront initier un nouveau cycle cellulaire qu'après avoir atteint une certaine masse critique. Ainsi, la cellule comportera assez de nutriments pour le prochain cycle cellulaire. Cette division est faite juste dans des conditions de suffisance nutritive, sinon les cellules sont dans un état de repos où elles ne sont pas doublées.

### 1.3.3. Le métabolisme

Un apport d'énergie est indispensable pour la croissance et le maintien de l'ordre biologique dans la cellule. La levure s'approprie cette énergie chimique stockée dans les molécules alimentaires, telles que les glucides. Avant que les sucres (e.g. glucose, fructose, etc.) puissent être transformés dans la cellule, ils doivent être transportés à travers la membrane plasmique. L'absorption des monohexoses dans la levure est principalement assurée par les transporteurs d'hexose (HXT). De même, des détecteurs de glucose peuvent exister afin de mesurer la disponibilité des sucres dans le milieu et répondre en sécrétant les transporteurs appropriés. C'est la réponse de l'action combinée de différents mécanismes de régulation, dont la régulation de la transcription de certains gènes HXT et l'inactivation des HXT dépendamment du glucose extracellulaire. Les levures, selon les conditions, peuvent utiliser les sucres par fermentation et/ou par respiration (Flores *et al.*, 2000; Concetta Compagno, Sofia Dahko, 2014). Comme la respiration des sucres est énergétiquement plus favorable que la fermentation, la plupart des organismes ne choisissent la voie fermentaire que lorsque la respiration est altérée, par exemple lorsque la disponibilité en oxygène diminue. Ces deux voies débutent par le stade initial de la glycolyse, la conversion du glucose en fructose-1,6-bisphosphate, qui sera décrit dans ce qui suit.

#### 1.3.3.1. La Glycolyse

Les sucres ne seront assimilés qu'après avoir été décomposé en plus petites molécules (**Figure 1.7**). La glycolyse, principal processus d'oxydation des sucres, est constituée d'une série de dix réactions. En premier lieu, le glucose est activé suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP pour générer du glucose 6-phosphate. Par la suite, une autre molécule d'ATP est utilisée pour générer un produit intermédiaire le fructose 1,6-biphosphate, qui peut jouer un rôle essentiel dans la régulation du flux de carbone dans la cellule. Le fructose 1,6-biphosphate est converti en deux produits à trois carbones, le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone phosphate. Ces deux intermédiaires peuvent être interconvertis de manière réversible. Ils sont ensuite oxydés en plusieurs étapes et les électrons sont éliminés par le nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD<sup>+</sup>), ce qui donne deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) (à partir d'une molécule de glucose). Les

## 1. Revue bibliographique

équivalents réduits doivent être réoxydés ultérieurement dans la chaîne respiratoire ou au cours des voies fermentaires pour maintenir l'équilibre redox. Quatre molécules d'ATP sont également générées au cours des dernières étapes glycolytiques aboutissant ainsi à la production finale de deux molécules d'ATP par molécule de glucose. Les produits de glycolyse finaux sont également deux molécules de pyruvate.

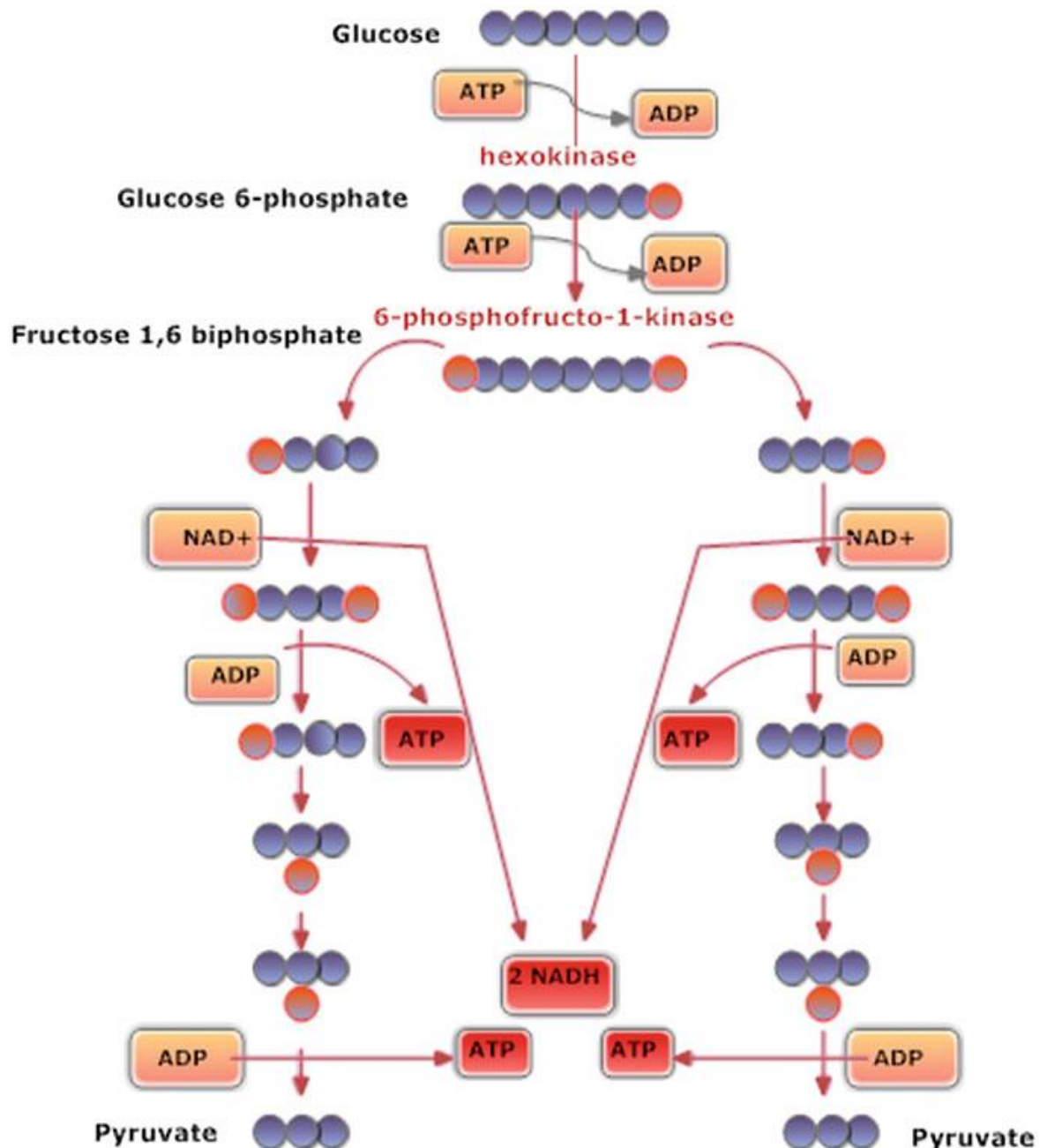


Figure 1.7. Voie métabolique de la glycolyse (Concetta Compagno, Sofia Dahko, 2014).

### 1.3.3.2. La respiration

Chez la plupart des organismes, le pyruvate est transporté vers les mitochondries où il est converti en acétyl-CoA et en CO<sub>2</sub> (Figure 1.8), qui sera ensuite totalement oxydé en CO<sub>2</sub> et



## 1. Revue bibliographique

H<sub>2</sub>O, en présence d'oxygène moléculaire. La conversion du pyruvate en acétyl-CoA est catalysée par le complexe pyruvate déshydrogénase dans les mitochondries.

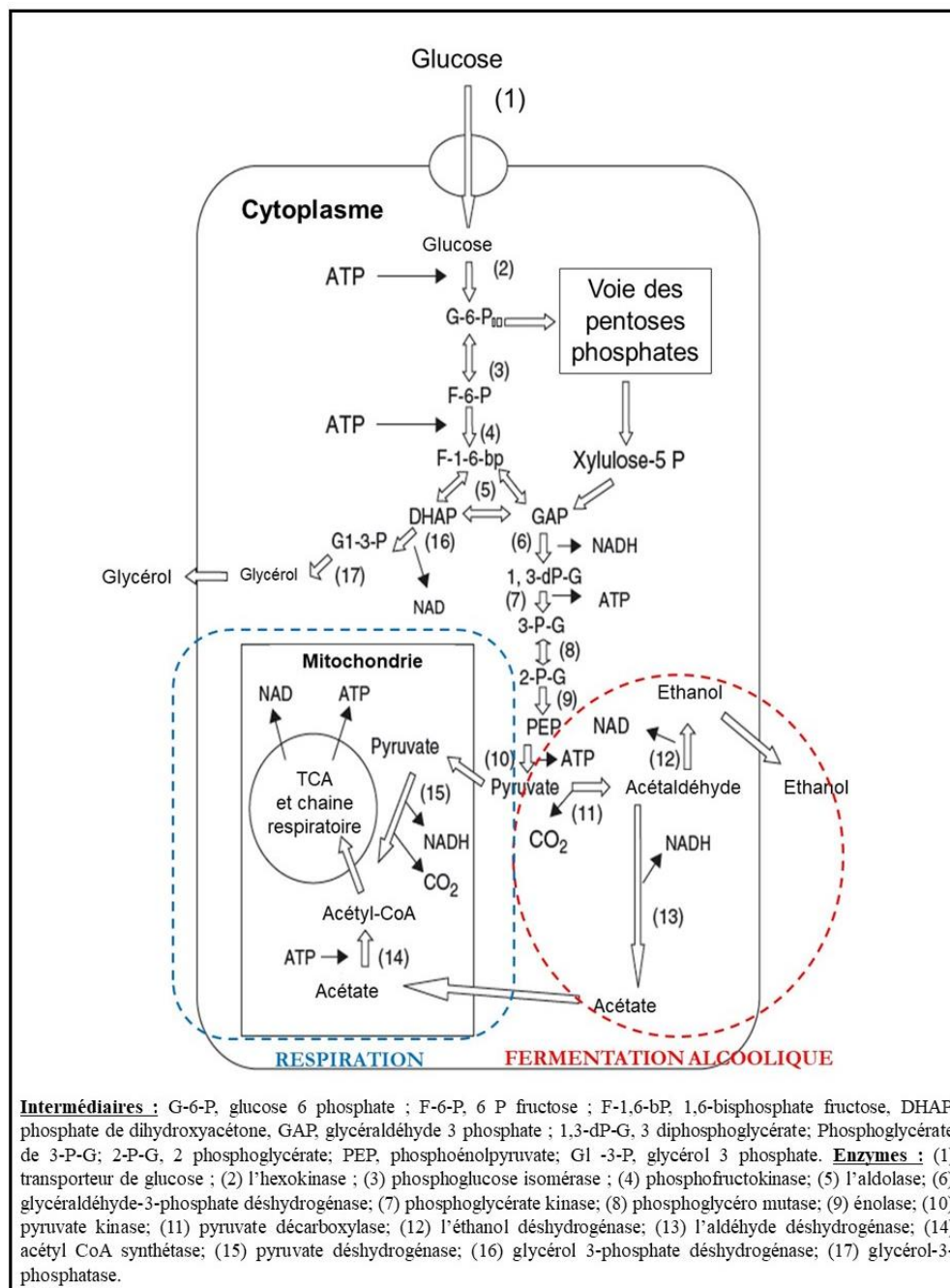


Figure 1.8. Une vue schématique des voies respiratoire et fermentaire de la levure adaptée de Thierie et Penninckx (2010).

### 1.3.3.3. La fermentation alcoolique

Dans des conditions anaérobiques, le sucre est fermenté. L'oxydation du glucose est donc incomplète (Teusink *et al.*, 1998).

Cette voie métabolique nécessite au moins 12 enzymes qui constituent 30 à 65% des protéines cytosoliques. 95% du glucose est transformé en CO<sub>2</sub> et le reste est transformé en

## 1. Revue bibliographique

---

produits secondaires tels que l'éthanol, le glycérol, des acides organiques, des esters, etc. Cette voie ne produit que deux molécules d'ATP supplémentaires par molécule de glucose par rapport aux deux molécules résultant de la glycolyse.

Même si les levures préfèrent la voie respiratoire la plus énergétique, le destin métabolique du pyruvate dépend en grande partie des conditions de croissance des levures. En d'autres termes, certaines levures ont la capacité de commuter de la respiration à la fermentation en présence de grande quantité de sucres même lorsque l'oxygène est abondant (Pronk, Steensma and Dijken, 1996; Piskur *et al.*, 2006). L'abondance du glucose dans le milieu accélère la glycolyse, engendrant la formation de grande quantité d'ATP. Ainsi, les enzymes du cycle de Krebs seront inhibées vu que la nécessité de ce cycle n'existe plus (Kurtzman et Fell, 2006).

### 1.3.4. La microflore des pommes

Chaque fruit est caractérisé par une microflore prédominante à la surface ou au sein de ses tissus. Cette microflore peut être affectée par l'environnement, la zone géographique, les conditions météorologiques, l'utilisation de pesticides, ou les conditions dans lesquelles le fruit se développe. L'étude microbiologique de la pomme, du jus de pomme et du cidre ont fait l'objet de plusieurs études.

La microflore de la pomme mure prête à la récolte est constituée de *Aureobasidium pullulans*, des espèces de *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Candida*, *Metschnikowia*, et *Kloeckera apiculata*. Graça *et al.*, (2015) ont constaté que les champignons (levures et moisissures) variaient de 3,6 à 7,1 log CFU/g sur les pommes fraîches. La plupart des isolats obtenus dans leur étude était relative à des souches de *Candida sake* et *Pichia fermentans*. Les isolats de *Hanseniaspora spp.*, *Candida spp.*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus spp.*, et *Cystofilobasidium infirmominatum* se trouvent à des pourcentages inférieurs (Teixidó *et al.*, 1999). Des espèces de *Saccharomyces* et d'autres levures sporulantes sont moins fréquentes. Un nombre faible de bactéries tolérantes aux acides, généralement les espèces d'*Acetomonas*, est fréquemment présent (Beech, 1972).

### 1.3.5. Les impacts de la levure sur la fermentation

Outre la composition chimique, la sélection de la levure a un effet important sur la fermentation. En fait, le rôle de la levure, au sens large, apparaît être en fermentation un thème très largement passionné, et sans doute assez méconnu. Le rôle de la levure pendant la fermentation ne réside pas seulement à la transformation des sucres en alcool, mais un métabolisme complexe en est derrière. Le métabolisme de chaque levure induit la formation de différents métabolites et sous-produits qui pourraient avoir un impact essentiel sur la qualité organoleptique du produit fermenté.

*Saccharomyces cerevisiae* est la principale espèce de levures utilisée lors de l'élaboration de boisson alcoolisée. D'autres espèces peuvent intervenir lors des fermentations spontanées, et jouer un rôle significatif mais de façon complexe et souvent imprévisible. En effet, Pasteur était le premier à remarquer la présence de différents types de microorganismes lors de la fermentation. Différentes levures peuvent être présentes au cours de la première étape de la fermentation, laissant ensuite la place à un autre type de levure, appelé maintenant *S. cerevisiae*

## 1. Revue bibliographique

---

(Barnett, 2000). Cette levure est largement utilisée pendant la fermentation due à son comportement contrôlé et répétitif ainsi que pour la libération de ses précurseurs d'arôme (Pretorius, van der Westhuizen et Augustyn, 1999; Ubeda et Briones, 2000; Dubourdiou *et al.*, 2006; Ugliano *et al.*, 2006). Cependant, la fermentation ne dépend pas d'un seul type de levure. C'est la collaboration de différents types et espèces de levures et de bactéries présentes initialement dans le produit ou retrouvées à la surface des presses et des fermenteurs qui donnera l'identité organoleptique du produit (Pretorius, van der Westhuizen et Augustyn, 1999).

Ainsi, le rôle des levures non - *Saccharomyces* apparaît important au cours du processus fermentaire. Plusieurs études ont signalé que les espèces non - *Saccharomyces* présentent des avantages qui peuvent améliorer la qualité des boissons fermentées en fonction des espèces et souches de levures utilisées. Les principales levures présentes dans les premiers stades de la fermentation appartiennent au genre *Hanseniaspora*, également connue sous le nom de *Kloeckera*, et au genre *Candida*. Ces espèces se caractérisent par une faible capacité de fermentation et sont sensibles à une concentration en alcool proche de 5 ou 6%. De plus, certaines modifications des paramètres de fermentation peuvent entraîner la présence de levures telles que les espèces de *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, et *Saccharomycodes* (Fleet, Lafon-Lafourcade et Ribereau-Gayon, 1984; Martínez, Millán et Ortega, 1989; Combina *et al.*, 2005). Certaines levures déjà citées ont un impact positif sur la fermentation en libérant des arômes favorables, mais d'autres peuvent libérer certaines substances menant ainsi à la formation d'arômes indésirables.

Les levures peuvent affecter respectivement les arômes primaires (déterminés par la composition initiale du produit), les arômes secondaires (créés pendant la fermentation) ainsi que les arômes tertiaires (générés lors de la maturation du produit fini) (Padilla, Gil et Manzanares, 2016). Les levures des types *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, et *S. pombe* produisent des quantités importantes d'acides gras volatils tels que l'acide acétique (Ciani et Maccarelli, 1998; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003; Romano *et al.*, 2003; Francesca Comitini *et al.*, 2011; Rantsiou *et al.*, 2012). Parallèlement, ils produisent peu d'alcools supérieurs (e.g. propyloxy, butyloxy, et amyloxy) (Romano et Suzzi, 1993; Rojas *et al.*, 2003; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2008), tandis que les esters et les composés soufrés sont principalement produits par *Candida*, *Hanseniaspora*, *T. delbrueckii*, et *K. gamospora* (Rojas *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2008).

Les levures non-*Saccharomyces* ont une activité enzymatique élevée telle que la  $\beta$ -glucosidase, l'estérase, et la  $\beta$ -lyase. Cette activité enzymatique contribue à une concentration plus élevée en terpènes et en thiols pouvant ajouter un arôme fruité et des parfums positifs au produit fermenté (Rosi, Vinella et Domizio, 1994; Spagna *et al.*, 2002; Cûs et Jenko, 2013; López, Mateo et Maicas, 2015). Wosiacki et Nogueira (2012) ont remarqué que les souches de *Hanseniaspora* sp. ont un impact positif sur le profil aromatique du cidre accentuant ainsi sur le rôle bénéfique de ces levures. En revanche, les espèces de *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, et *Saccharomycodes* ont une influence négative sur le produit (Shinohara, Kubodera et Yanagida, 2000). La présence de *Brettanomyces* peut engendrer des défauts de goût et la présence d'une odeur désagréable,

## 1. Revue bibliographique

---

semblable à celle des souris, qui pourra être détectées dans les boissons. Trois substances sont à l'origine de cette odeur : la 2-éthyltétrahydropyridine, la 2-acétyltétrahydropyridine, et la 2-acétylpyrroline. Ces substances pourront être produites par les levures *Brettanomyces*. D'un autre côté, les levures non-*Saccharomyces* ont d'autres influences positives sur la fermentation alcoolique. En effet, de nos jours l'œnologie moderne cherche des stratégies pour réduire la teneur finale en éthanol dans les boissons fermentées. Cette tendance est due à la demande des consommateurs des produits avec une teneur inférieure en éthanol. Des méthodes alternatives comme la filtration enzymatique ou osmotique peuvent être utilisés pour réduire la teneur en éthanol (Röcker, Schmitt, *et al.*, 2016). L'utilisation des espèces non-*Saccharomyces* permettent de réduire la teneur initiale en éthanol d'environ 1 à 2 % (v/v), dépendamment des espèces de levures et des conditions fermentaires (Contreras *et al.*, 2014; Ciani *et al.*, 2016; Röcker, Strub, *et al.*, 2016). En outre, ces levures peuvent être utilisées pour réguler l'acidité des boissons (Benito, 2018; Benito, Calderón et Benito, 2019) vu que les levures *Saccharomyces* n'ont aucune influence significative sur l'acidité (Redzepovic *et al.*, 2003; Zelle *et al.*, 2008) et les méthodes chimiques classiques consistent à l'ajout des produits chers et qualifiés étant de qualité alimentaire.

On peut ainsi déduire que les fermentations spontanées dirigées par des levures non connues peuvent ainsi résulter à des rendements imprévus. Cependant, plusieurs producteurs tentent à prendre ces risques afin d'avoir des produits authentiques et de différents styles de boissons fermentés. Ces producteurs croient que les souches indigènes produisent des concentrations plus élevées en glycérols et polyols, aboutissant ainsi à des qualités organoleptiques distinctives. Ceci est appuyé par Cûs et Jenko (2013) qui ont noté que les hybrides choisis de *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* offrent une meilleure saveur ou qualité de vin que la souche de référence. Cependant, en parallèle, de nombreuses caves modernes exigent des fermentations fiables et rapides ayant une qualité et un goût prédictible, alors ils sélectionnent des souches avec des activités connues. De nos jours, les souches les plus utilisées dans l'industrie sont *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolères*, *S. pombe*, *Metschnikowia pulcherrima*, et *Pichia kluyveri*. Il est probable que dans les prochaines années de nouvelles espèces commenceront à être disponibles sur le marché, et les produits contenant des combinaisons d'espèces autres que *Saccharomyces* seront également disponibles pour simuler des fermentations alcooliques spontanées.

Nous détaillerons dans ce qui suit les effets de la levure *Hanseniaspora* sur la fermentation vue que cette souche sera utilisée durant les différentes études de cette thèse.

Les espèces du genre *Hanseniospora* se caractérisent par une forme apiculée. La plupart de ces levures sont présentes au début de la fermentation spontanée (Pretorius, 2000; Zohre et Erten, 2002; López-Domènech, Mateo et Maicas, 2015; Leixa *et al.*, 2016; Martín *et al.*, 2018). Jusqu'à lors aucun fabricant n'a proposé de souche commerciale bien que ce genre est censé constituer un pourcentage important des levures présentes dans les raisins. Cela indique que, le genre *Hanseniospora* influence notamment les fermentations alcooliques au cours de la première phase. Il a été rapporté que la combinaison de *S. cerevisiae* avec des souches du genre *Hanseniospora* peut avoir une influence positive sur la qualité du vin (Jolly, Varela et Pretorius, 2014; Martín *et al.*, 2018). Wosiacki et Nogueira (2012) ont également remarqué que les

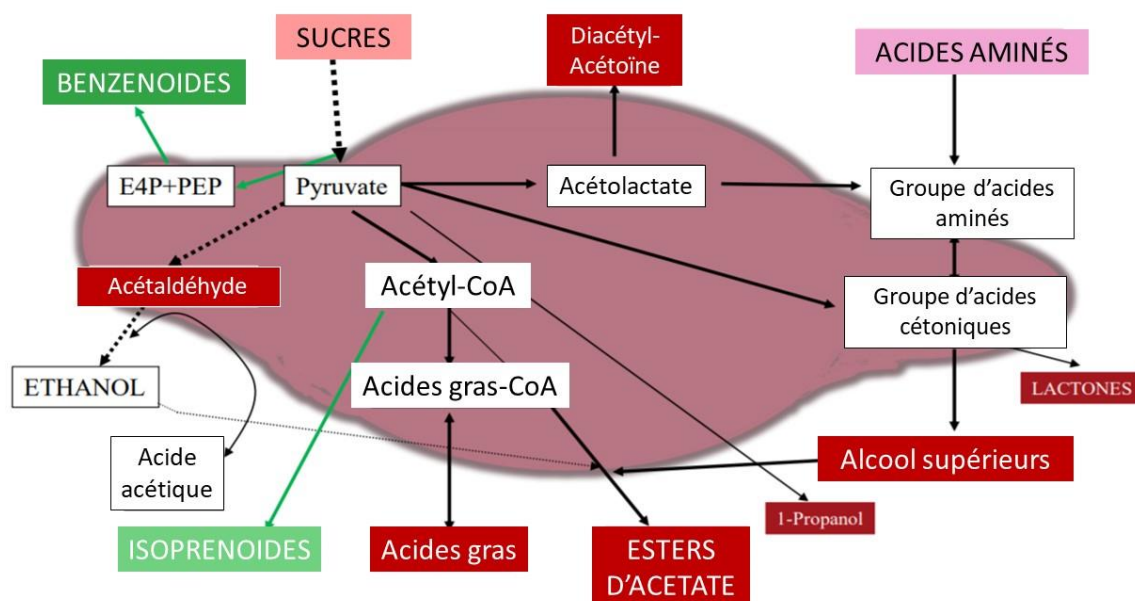
## 1. Revue bibliographique

---

souches du genre *Hanseniaspora* ont un impact positif sur le profil aromatique du cidre accentuant ainsi sur le rôle bénéfique de ces levures. Le genre *Hanseniaspora* renferme également des enzymes importantes pour les défis modernes de la vinification (Martín *et al.*, 2018). L'activité enzymatique la plus remarquable concerne la  $\beta$ -glucosidase (Garijo *et al.*, 2015), la  $\beta$ -xylosidase (Hu, Jin, Xu, *et al.*, 2018), la glycolytique et la protéase (Pérez *et al.*, 2011; López-Domènech, Mateo et Maicas, 2015). Il a été récemment signalé que, parmi les levures non-*Saccharomyces* qui contribuent à la qualité organoleptique des vins, *H. uvarum* avait l'activité enzymatique la plus importante (Jolly, Varela et Pretorius, 2014; Padilla, Gil et Manzanares, 2016).

D'un point de vue sensoriel, les améliorations apportées par ces levures sont une saveur plus intense et des arômes plus complexes. Les espèces *H. guilliermondii* et *H. vineae* se distinguent par la production de grandes quantités d'acétate de phényléthyle. Cet ester est associé à des arômes sensoriels fruités, floraux et miel (Lambrechts et Pretorius, 2000; Rojas, J. V Gil, *et al.*, 2003; Swiegers *et al.*, 2005). À l'échelle industrielle, *H. guilliermondii*, *H. uvarum* et *H. vineae* sont les espèces les plus appropriées pour atteindre ces objectifs (Medina *et al.*, 2013; Martín *et al.*, 2018). D'un point de vue chimique, ces améliorations peuvent être expliquées par la production de concentrations plus élevées d'acétate 2-phényléthyle (Viana *et al.*, 2011; Tristezza *et al.*, 2016), d'esters d'acétate tels que l'acétate d'isoamyle (Medina *et al.*, 2013; Lleixa *et al.*, 2016; Tristezza *et al.*, 2016; Hall *et al.*, 2017; Hu, Jin, Xu, *et al.*, 2018), d'esters d'éthyle d'acides gras à chaîne moyenne (Hu, Jin, Mei, *et al.*, 2018), de benzénoïdes (Martín, Boido, *et al.*, 2016; Martín, Giorello, *et al.*, 2016), et de terpènes (Hu, Jin, Xu, *et al.*, 2018; Martín *et al.*, 2018) et par la réduction de la concentration finale en alcools supérieurs (Medina *et al.*, 2013; Lleixa *et al.*, 2016; Hall *et al.*, 2017). Martín *et al.*, (2018) ont expliqué les principales voies métaboliques responsables de la capacité de certaines espèces du genre *Hanseniaspora* à produire des benzénoïdes, de la diacétylacétoïne, des lactones, des alcools supérieurs, d'esters d'acétates, des acides gras et des isoprénoïdes décrites par la figure 1.9.





**Figure 1.9. Schématisation adaptée de Martín *et al.*, (2018) des composés aromatiques de fermentation produits par les levures *Hanseniaspora* lors de la production de vin (en rouge et vert), les voies métaboliques spécifiques mises en évidence chez certaines espèces de ce genre sont indiquées en vert (flèches et encadrés), les éléments nutritifs moyens (en rose) et les flèches en pointillés indiquent la principale voie de glycolyse de la fermentation primaire.**

Les espèces les plus appropriées pour améliorer la couleur et la composition polyphénolique des vins rouges du genre *Hanseniaspora* sont *H. clermontiae*, *H. opuntiae*, *H. guilliermondii* et *H. vinae* (Martín *et al.*, 2018). Ces espèces peuvent améliorer les paramètres de qualité tels que l'intensité de la couleur et les anthocyanines totaux (Lleixa *et al.*, 2016). Ces améliorations de couleur sont basées sur la capacité des espèces de *Hanseniaspora* à produire de la vitisine A, de la vitisine B, et du malvidine-3-O-glucoside-4-vinylguaiacol (Medina *et al.*, 2018).

### 1.3.6. Les impacts des facteurs extérieurs agissant sur le métabolisme des levures

Afin d'obtenir une fermentation optimale en tant que vitesse spécifique de croissance ou de production, il est essentiel d'ajuster et de contrôler différents paramètres extérieurs.

#### 1.3.6.1. La composition du milieu

Afin de se croître et se reproduire, la composition initiale du milieu doit être riche en nutriments. Les macronutriments sont des sources de carbone, azote, et phosphate. De plus, les vitamines et les minéraux sont des précurseurs de voies métaboliques ou des cofacteurs d'enzymes. La quantité présente des différents nutriments doit être bien adéquate afin de répondre aux besoins de la levure.

#### 1.3.6.2. La température

La température est un facteur clé influençant l'activité des levures. Chaque levure peut croître à des températures bien spécifiques (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Fleet (1992) suggère

## 1. Revue bibliographique

---

que différentes souches sont plus ou moins adaptées à différentes températures, allant de 10 à 30 °C. Plus précisément, le taux de croissance varie d'une souche à l'autre en fonction de la température. Les œnologues bordelais ont consacré de nombreuses recherches à ce sujet, qui ont été résumées par Ribereau-Gayon *et al.*, (1975). La température affecte profondément l'intensité respiratoire et fermentaire des levures : l'intensité de la fermentation double pour chaque augmentation de température de 10 °C. Elle atteint son maximum à 35 °C et commence à diminuer à 40 °C.

### 1.3.6.3. Le pH

Une acidité élevée du milieu peut induire des fermentations lentes ou bloquées, mais un pH élevé peut aussi causer des méfaits plus graves à la fermentation. Une autre conséquence indésirable d'un pH bas est la formation d'acidité volatile par la levure.

### 1.3.6.4. La concentration des cellules

La concentration des cellules de levure et leur agrégation pourraient avoir un effet inhibiteur sur le métabolisme de la levure. Par exemple, une concentration élevée conduit à une concurrence sur les substances nutritives disponibles (Ciftci, Constantinides et Wang, 1983).

### 1.3.6.5. Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est un produit majeur de la fermentation. Chaque mole d'éthanol produite est couplée à une mole de CO<sub>2</sub>. Ce CO<sub>2</sub> est en même temps un activateur et un inhibiteur des levures. Dans des conditions normales, le CO<sub>2</sub> est libéré et n'exerce aucune inhibition sur la fermentation. Toutefois, une augmentation de ce gaz sera inhibitrice, cela est fréquent pendant les fermentations sous pression. Une légère pression interne dans le réservoir est suffisante pour ralentir la fermentation.

### 1.3.6.6. L'éthanol

L'éthanol produit pendant la fermentation est toxique pour les levures et peut inhiber leur fonction (Carlsen, 1991). Il est stipulé que l'éthanol pourrait dénaturer certaines enzymes (e.g. hexokinases, alcool déshydrogénase) ou perturber leurs sites actifs. Un lien existe entre l'effet inhibiteur de l'éthanol et les changements structuraux de la membrane plasmique. Cela pourrait entraîner une augmentation de la perméabilité aux ions avec une déstabilisation de l'équilibre des charges transmembranaires. Ainsi, l'éthanol produit par la fermentation ralentit l'assimilation de l'azote (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

D'autres conditions extérieures du milieu, autre que celles citées auparavant, pourront avoir un impact sur la fermentation. Un stress peut être créé lors de la fermentation agissant ainsi sur la viabilité des cellules de levures ou au moins perturber leur croissance normale. Nous découvrons alors plus bas des modifications sur le procédé comme des traitements qui pourront créer un stress cellulaire. Nous détaillerons le stress, ses origines et son effet sur la fermentation, et en particulier sur les levures.

### 1.4. Le procédé fermentaire : les traitements physiques

#### 1.4.1. Le stress

Toutes les cellules ont la capacité de réagir aux changements environnementaux. De telles réponses nécessitent un réseau complexe de connexion de détection et de traduction des signaux menant ainsi à des adaptations de la croissance cellulaire. De même, des ajustements au niveau du programme de l'expression génétique et de l'activité métabolique ont lieu. Les conditions environnementales qui menacent la survie d'une cellule, ou au moins qui empêchent son fonctionnement optimal, sont habituellement connues comme « stress cellulaire » (Hohmann, 2003).

#### 1.4.2. La réponse au stress cellulaire

La réponse cellulaire au stress vise nécessairement la protection cellulaire des effets néfastes du stress et la réparation des dommages en résultant. Les réponses protectrices des cellules vivantes ont été initialement identifiées dans des études sur la réponse au choc thermique. Les levures, vivant librement dans la nature, sont confrontées à de grandes variations dans leur environnement naturel. Des mécanismes à action rapide sont essentiels pour la survie de ces cellules face aux changements environnementaux brusques, ainsi que de puissants mécanismes d'adaptation sont indispensables pour maintenir leur capacité de prolifération. Les changements environnementaux peuvent être de nature physique ou chimique : température, pression, rayonnement, concentration de solutés et d'eau, présence de certains ions, agents chimiques toxiques, pH, et disponibilité des éléments nutritifs.

Il est intéressant de noter que dans plusieurs cas, il a été démontré que l'exposition à un type de stress conduisait également à la tolérance à d'autres types de stress. Ce phénomène de protection croisée suggère que différentes conditions de stress nécessitent des réponses cellulaires communes, telles que l'ajustement du métabolisme énergétique et la production de protéines protectrices (telles que les protéines de choc thermique) ou de petites molécules protectrices (solutés compatibles tels que le glycérol ou le tréhalose).

En outre, pour d'autres réponses au stress, le renforcement des activités cellulaires basales joue un rôle important. La réponse de la levure aux conditions d'hyperosmolarité (osmostère) est caractérisée, entre autres, par l'ajustement du métabolisme du glycérol et l'initiation de l'accumulation de glycérol. Le glycérol est normalement produit par les cellules en tant que sous-produit du métabolisme glycolytique et sécrété dans le milieu de croissance ou métabolisé à nouveau. Le stress ionique présente des caractéristiques communes avec le stress hyperosmotique, mais évoque également des systèmes physiologiques couramment impliqués dans l'homéostasie ionique. D'une autre part, la réponse de la levure au stress oxydatif est le reflet de la protection contre les dommages oxydatifs, qui est normalement actif dans les cellules de levure produisant de l'ATP oxydant en présence d'oxygène. La protection contre les dommages oxydatifs englobe, conjointement avec d'autres, l'action de composés réducteurs produits par la cellule, telles que le glutathion et la thiorédoxine, ainsi que des activités enzymatiques telles que la superoxyde dismutase ou la catalase. Lorsque les cellules répondent à un stress brusque, elles le font en différentes phases comme suit :



## 1. Revue bibliographique

---

- 1- Initiation de modifications cellulaires immédiates comme conséquence directe de l'exposition au stress et des dommages générés ;
- 2- Déclenchement des processus de défense ;
- 3- Prolifération des cellules adaptées.

Selon le type de stress, ces différentes phases peuvent être clairement distinguées ou pas. Pour illustrer cette situation, la réponse au choc hyperosmotique servira comme exemple. Lorsque les cellules de levure sont exposées à une augmentation de l'osmolarité externe par addition de fortes concentrations de sel ou de sucre au milieu, une perte immédiate de l'eau intracellulaire a lieu, conduisant à un rétrécissement cellulaire. Cela évoque des modifications intracellulaires immédiates telles que l'entrée de l'eau dans la vacuole et l'effondrement du cytosquelette. La phase de réponse consiste en un arrêt immédiat et transitoire de la croissance à la transition G1 ou G2/M du cycle cellulaire, une réduction du transport transmembranaire du glycérol, un déclenchement de la voie de la kinase et l'activation de l'expression génique. Dans la phase adaptative, le glycérol intracellulaire s'accumule, le métabolisme énergétique cellulaire est ajusté, le cytosquelette est réparé, l'architecture des parois cellulaires est modifiée, et la croissance reprend de nouveau dès que la cellule atteint sa taille dans ces conditions (Hohmann, 2003).

Comme déjà décrit, la cellule peut être affectée par de simples variations environnementales et peut changer et modifier son métabolisme pour survivre. Les chercheurs se sont alors intéressés à créer un « stress cellulaire » par différentes méthodes telles que les méthodes physiques, pour étudier et profiter de cette capacité d'adaptation cellulaires. On s'intéressera à développer les traitements physiques spécifiquement les traitements par US et par CEP ; deux techniques étudiées lors de cette thèse.

### 1.4.3. Les traitements physiques

Dans des conditions spécifiques, les traitements physiques peuvent être considérés comme des inducteurs de stress. De nombreuses applications industrielles ont été développées spécifiquement pour l'inactivation des microorganismes (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999; Heinz et Alvarez, 2002; Heinz, Toepfl et Knorr, 2003; Álvarez, Condón et Raso, 2006; Zakhem *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2017). Cependant, dans d'autres conditions, les variations au niveau du métabolisme des microorganismes qui peuvent être engendrées auront des effets bénéfiques. Récemment, de nombreux chercheurs ont étudié différentes méthodes pour la stimulation de la croissance et du comportement métabolique des microorganismes afin d'optimiser leur capacités reproductrices (Montané et Teissié, 1992; Teissié *et al.*, 2002). À cet égard, il a été démontré que diverses technologies émergentes avaient un effet stimulant sur le processus de multiplication de la flore microbienne (Goodman, Greenebaum et Marron, 1995; Goodman et Blank, 1998; Nikolic *et al.*, 2010). De ces méthodes nous évoquerons les US et les CEP dans ce qui suit.

#### 1.4.3.1. Les ultrasons

##### 1.4.3.1.1. Définition

Les US sont des ondes mécaniques sonores dont la gamme de fréquence se situe entre 15 kHz et 500 MHz. Ces ondes peuvent se propager dans un solide, liquide ou un gaz. La

## 1. Revue bibliographique

---

manipulation des équipements US est simple et facile. Yao *et al.*, (2014) reportent qu'elle est caractérisée par une faible consommation d'énergie ce qui lui confie un grand intérêt vis à vis des scientifiques.

### 1.4.3.1.1.1. Les US de faibles intensités

L'application des US de faibles intensités se caractérisent par des fréquences de plus de 100 kHz et des intensités inférieures à 1 W/cm<sup>2</sup>. Ces US peuvent être utilisés pour l'analyse et la surveillance non invasives de nombreux matériaux alimentaires pendant le traitement et le stockage afin d'assurer les normes de qualité et de sécurité, pour évaluer la composition des produits de viande crus et fermentés .

### 1.4.3.1.1.2. Les US de fortes intensités

Les ultrasons de fortes intensités se caractérisent par des intensités supérieures à 1 W/cm<sup>2</sup> à des fréquences entre 20 kHz et 500 kHz, qui sont perturbateurs et affectent les propriétés physiques, mécaniques ou chimiques/biochimiques des aliments. Ces effets peuvent trouver plusieurs applications dans la transformation et la préservation des aliments (Santos *et al.*, 2009). Cette technologie a été appliquée pour contrôler la microstructure et modifier les propriétés texturales des produits gras (sonocristallisation) ainsi que pour l'émulsification, démoussage et modification des caractéristiques fonctionnelles de différentes protéines alimentaires. Elles peuvent également désactiver ou accélérer l'activité enzymatique, augmenter la durée de conservation et la qualité des produits alimentaires, inactiver les micro-organismes et faciliter l'extraction de plusieurs ingrédients bioactifs alimentaires (Awad *et al.*, 2012).

La compression et la raréfaction des particules moyennes et l'effondrement des bulles qui en résulte est connu sous le nom de cavitation et son effet est plus important lors de l'application de haute puissance.

Les US de haute puissance ont été récemment appliqués à grande échelle telles que l'émulsification, l'homogénéisation, l'extraction, la cristallisation, la pasteurisation à basse température, etc.

### 1.4.3.1.2. La cavitation

Lorsque les US traversent le milieu, la distance moyenne entre les molécules variera en fonction de leur oscillation autour de leur position moyenne. Un milieu liquide passe alors par des cycles de compression et de raréfaction (**Figure 1.10**). Pour une pression négative suffisamment grande, la distance entre les molécules du liquide dépasse la distance moléculaire minimale requise pour maintenir le liquide intact, ce qui cause sa décomposition et la création du vide, ce que l'on appelle les bulles de cavitation (Mason *et Lorimer*, 1989; Mason, 1991).

## 1. Revue bibliographique

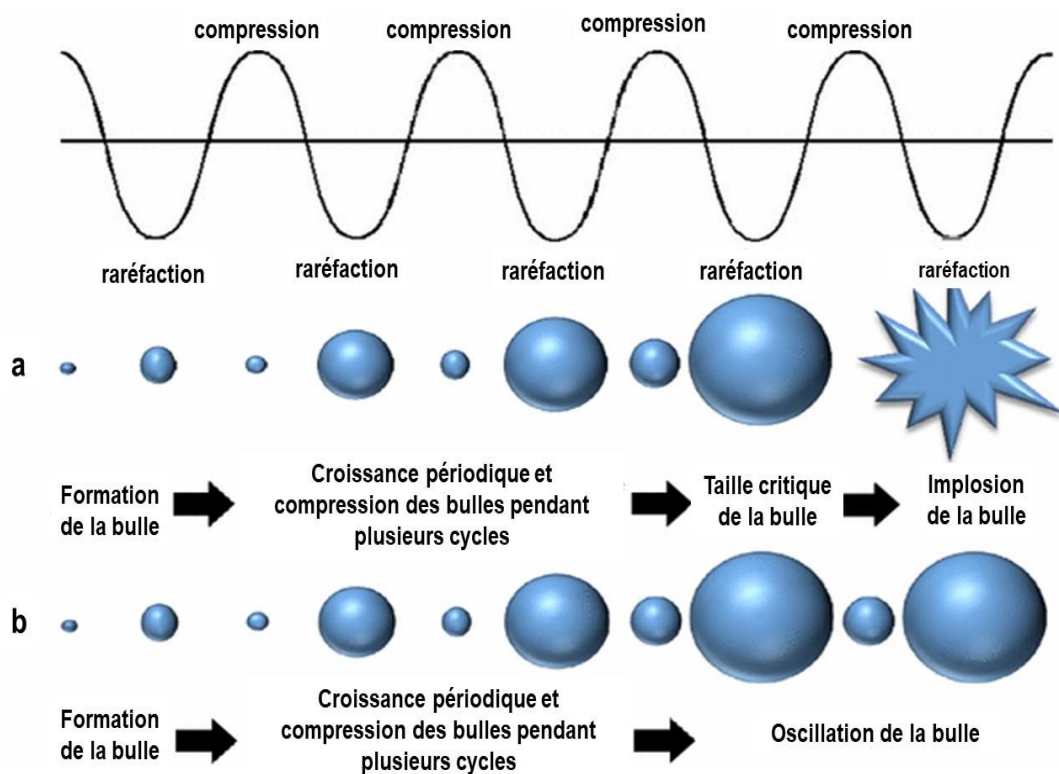


Figure 1.10. Schéma du processus de cavitation acoustique a. inerte (transitoire) et b. stable adapté de Izadifar, Babyn et Chapman, (2019).

Les US de faible intensité ( $1-3 \text{ W/cm}^2$ ) générant de stable cavitation sont adoptées industriellement pour le contrôle de la qualité des produits (Leong, Ashokkumar et Kentish, 2011). Par contre, les US de forte intensité ( $10-1000 \text{ W/cm}^2$ ) générant des cavitations transitoires servent à la modification et la rupture physique des tissus (Feldman, 1989; Santos et Lodeiro, 2009). Les bulles transitoires se dilatent en quelques cycles acoustiques jusqu'à un rayon d'au moins deux fois leur taille initiale, avant de s'effondrer violemment lors de la compression (Feldman, 1989; Santos et Lodeiro, 2009; Cleveland et Mcateer, 2012).

### 1.4.3.1.3. L'application des US

L'ultrasonication peut être appliquée de deux manières : directement sur l'échantillon ou indirectement à travers les parois du récipient à échantillon.

#### 1.4.3.1.3.1. L'application directe

L'application directe est réalisée au moyen de sondes à US, qui sont immergées dans l'échantillon, exécutant des US directement sur la solution, sans franchir aucune barrière autre que la solution elle-même. Cette approche présente plusieurs inconvénients. Par exemple, on peut s'attendre à une contamination des échantillons avec les métaux se détachant de la sonde. Bien que les sondes à US modernes soient en titane de haute pureté, une contamination par des métaux tels que le Cr ou l'Al a été rapportée (Wibetoe *et al.*, 1999). Les sondes à US modernes en verre réduisent considérablement ce problème (Santos et Capelo, 1999). Un autre inconvénient provient du fait que la plupart des sondes à US sont utilisées dans des approches ouvertes, c'est-à-dire que le conteneur d'échantillon n'est pas scellé pendant le traitement. Par conséquent, certaines molécules volatiles peuvent être perdues.

## 1. Revue bibliographique

La forme et la taille du réacteur sont des facteurs importants à prendre en compte lors de l'application directe des US. La forme du réacteur influe sur la réflexion des ondes ultrasonores (Thangavadivel *et al.*, 2013). Le choix du réacteur adéquat évite ainsi les zones mortes, où la cavitation n'est pas atteinte et surviennent généralement lorsque de grands volumes d'échantillons sont soumis aux US, quel que soit le milieu utilisé. Les phénomènes de cavitation diminuent très rapidement axialement et radialement, de sorte que de faibles volumes augmentent la zone d'exposition (Santos, Lodeiro et Capelo-Martínez, 2009). C'est pourquoi il est important de garder une courte distance entre la paroi du réacteur et la pointe de la sonde (Capelo *et al.*, 2005). Comme nous l'avons vu précédemment, les US ont été utilisés à diverses fins, ce qui a conduit au développement de différents appareils à US. Même les appareils à US identiques peuvent être utilisés à des fins différentes, en fonction de la méthode d'application et de l'énergie fournie.

### 1.4.3.1.3.2. L'application indirecte

L'application indirecte est généralement réalisée à l'aide d'un bain à US, bien que les approches modernes exploitent le puissant sonoréacteur (Santos et Capelo, 1999). Dans les deux cas, l'onde ultrasonore doit d'abord traverser le liquide à l'intérieur du dispositif à US, puis traverser la paroi du récipient à échantillon. Par conséquent, l'intensité des US à l'intérieur du récipient à échantillon est inférieure aux prévisions. Les bains à US n'étant pas des appareils puissants, leurs applications sont fortement limitées par le manque d'intensité des US. Cependant, comme mentionné ci-dessus, de nos jours, un sonoréacteur peut être utilisé à la place d'un bain à US dans certaines applications courantes. En fermentation liquide, les US générés à l'aide d'un transducteur sont transmis au milieu à l'aide d'un bain à US ou d'un système à sonde. La figure 1.11 illustre ces deux types de systèmes à US, couramment utilisés dans les réacteurs de fermentation.

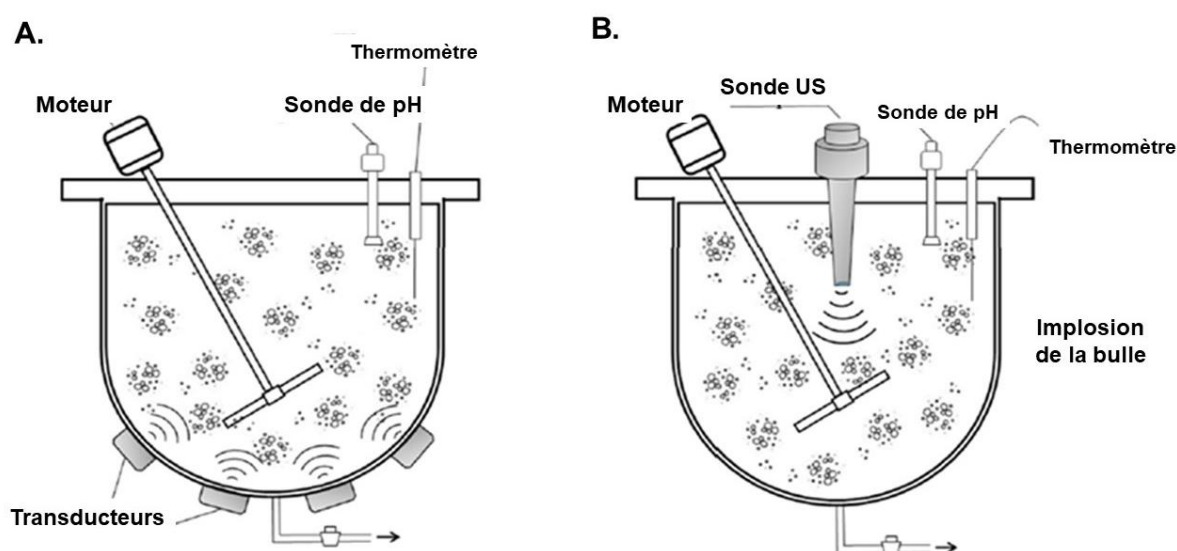


Figure 1.11. Bioréacteurs assistés par US : A. Sonication réalisée avec des transducteurs placés à l'extérieur de la cuve de fermentation ; B. Sonication réalisée à l'aide d'une sonde à US, adaptée de Galv et Carciochi, (2018).

## 1. Revue bibliographique

---

La cavitation ultrasonique est un phénomène physique dont les performances dépendent de plusieurs paramètres. Les trois principaux groupes de facteurs affectant les résultats du traitement des microorganismes sont : les paramètres influents sur le seuil de cavitation, les propriétés des milieux de culture ; et enfin les propriétés microbiennes.

### 1.4.3.1.4. Les facteurs agissant sur le traitement par US

#### 1.4.3.1.4.1. Le seuil de cavitation

Une intensité plus grande provoque un effondrement plus violent des microbulles qu'une intensité plus faible (Mason, 1996). Ainsi, le taux d'inactivation des micro-organismes augmente généralement avec l'intensité croissante des US. Les microbes sont plus résistants aux US à hautes fréquences que celles à basses fréquences, ce qui est principalement dû au fait que, dans un cycle de raréfaction et de compression court, il est difficile de produire des microcavitations. De plus, comme la pression de vapeur augmente rapidement et que des bulles de cavitation sont générées rapidement, les bactéries et autres microbes tels que les levures sont plus sensibles à l'ultrasonication à haute température. Sous haute pression, les microbulles peuvent aussi s'effondrer plus rapidement et plus violemment.

#### 1.4.3.1.4.2. L'intensité et l'amplitude

Généralement, plus l'amplitude d'intensité des US appliqués est élevée, plus le degré d'inactivation des microorganismes est important, due à une libération d'énergie plus importante. Il a été constaté que le taux d'inactivation de *Mycobacterium* sp. 6PY1 augmentait avec l'augmentation de la puissance ultrasonore (Bsoul *et al.*, 2010).

#### 1.4.3.1.4.3. La fréquence

Il est difficile de déterminer si les US à haute ou basse fréquence sont plus efficaces pour l'inactivation des bactéries pour les raisons exposées ci-dessus. Bien que les forces de cisaillement produites par les US à haute fréquence soient moins violentes que celles produites par les US à basse fréquence, le nombre de radicaux hydroxyles générés à basse fréquence est plus élevé. Il a été constaté que le taux de destruction des US de fréquence 20 et 38 kHz était significativement plus élevé que celui des US ayant une fréquence de 512 et 850 kHz, pour l'inactivation de *B. subtilis* (Joyce *et al.*, 2003). Le pourcentage d'inactivation de *Mycobacterium* sp. 6PY1 était plus faible à haute fréquence (612 kHz) qu'à basse fréquence (60 kHz) à la même densité de puissance (114 W/L), et le pourcentage était respectivement de 43% et 93% (Bsoul *et al.*, 2010). *E. coli* et *Klebsiella pneumonia* ont également présenté une diminution continue et significative de leur nombre après traitement par US avec une intensité de 0,012 W/cm<sup>3</sup> pendant 15 min. A une fréquence de 20 kHz, 6,06% des cellules vivantes d'*E. coli* sont présentes, tandis que 18,9% étaient toujours vivantes lorsqu'elles ont été traitées par US à 40 kHz (Joyce, Al-Hashimi et Mason, 2011). Cependant, Koda *et al.*, (2009) ont rapporté que l'état d'inactivation de *E. coli* IAM12058 était légèrement supérieur à 500 kHz qu'à 20 kHz, avec la même puissance de sonication (1,7-12,4 W).

#### 1.4.3.1.4.4. La température et la pression externe

Généralement, les bactéries présentent une sensibilité accrue au traitement par US dans un environnement à haute température. L'augmentation de la température entraîne une augmentation de la tension de vapeur (Mason et Lorimer, 1989), une génération rapide des



## 1. Revue bibliographique

---

bulles de cavitation (Earnshaw, Appleyard et Hurst, 1995), et une diminution de la viscosité du fluide. Ainsi, une diminution du seuil de puissance des US pour la génération de cavitation peut avoir lieu. Des résultats de la littérature ont montré que les US à une température modérée (50 - 60 °C) étaient plus efficaces pour l'inactivation microbienne que les US à température ambiante (Ciccolini *et al.*, 1997; Russell, 2002). D'un autre côté, une augmentation des effondrements rapides et violents des microbulles se produit lorsque la pression externe augmente (Mason et Lorimer, 1989).

### 1.4.3.1.4.5. *Les propriétés des milieux de culture*

Les cavités ne peuvent pas être générées facilement dans des milieux très visqueux car la vibration des US est entravée (Salleh-Mack et Roberts, 2007). Il existe encore quelques désaccords sur les effets du volume soniqué, du pH du milieu et du nombre initial de biomasse sur le traitement des bactéries. Le volume de la suspension bactérienne utilisée dans les différentes études varie considérablement de quelques millilitres à plus de 1 L (Lee, Heinz et Knorr, 2003; Valero *et al.*, 2007). Ces volumes utilisés dépendent de l'équipement à US et de l'objectif des expériences. Normalement, le taux d'inactivation diminue avec l'augmentation du volume lorsque les mêmes équipements et conditions ultrasonores sont utilisés. Ceci est dû au fait que l'énergie ultrasonore réelle délivrée par millilitre de milieu (c'est-à-dire, W/ml) est supérieure pour un petit volume de suspensions de travail que pour un volume plus important (Huang, Mittal et Griffiths, 2006). Il a également été signalé que le pH, compris entre 4,0 et 7,0 n'influçait pas les effets du traitement (20 kHz, 117 µm, 200 kPa) sur *C. sakazakii* (Arroyo Casabona *et al.*, 2011).

### 1.4.3.1.4.6. *Les propriétés des microorganismes*

Chaque espèce de microorganismes a des distinctes sensibilités aux US. L'idée que les bactéries à Gram positif sont plus résistantes aux US que les bactéries à Gram négatif domine dans la littérature depuis un certain temps. Cependant, récemment, certaines publications ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'inactivation des deux types de bactéries. Des désaccords ont été également signalés lors de l'examen de la forme et de la taille des microorganismes.

**Le type de paroi cellulaire :** Certains rapports, dès 1975, ont montré que les bactéries Gram-négatives étaient plus sensibles à l'inactivation ultrasonore que les bactéries Gram-positives, du fait que la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives était plus fine et plus fragile que celle des bactéries Gram-positives (Ahmed et Russell, 1975). Les streptocoques à Gram positif ont été signalés comme étant plus résistants aux US que les coliformes du groupe de bactéries Gram négatif (Blume et Neis, 2004).

**Taille et forme :** Il a été rapporté que les cellules de grandes tailles étaient plus susceptibles aux US que les petites cellules (Nesaratnam, Wase et Blakebrough, 1982). C'est principalement due au fait qu'elles ont une surface plus grande, ce qui se traduit, sous US, par des forces de traction plus élevées que dans le cas des microorganismes à plus petite taille (Thacker, 1973; Joyce, Al-Hashimi et Mason, 2011). De même, il a été suggéré que les plus grosses cellules de *K. pneumoniae* NCTC 418 étaient plus sensibles au traitement par US en raison de leur grande section transversale (Nesaratnam, Wase et Blakebrough, 1982). Les bactéries en forme de

## 1. Revue bibliographique

---

bâtonnets seraient également plus sensibles que les cellules en forme de coccus en raison de leur rapport surface / volume cellulaire (Chemat, Zill-e-Huma et Khan, 2011).

**Phases de croissance** : L'effet des US sur les micro-organismes dans leurs différentes phases de croissance n'a pas été étudié de manière approfondie. Cependant, il a été signalé que les cellules de levure en division (phase exponentielle) étaient plus altérables par US que lors de leur phase stationnaire, car les cellules de levure en division ou les cellules diploïdes étaient beaucoup plus grandes que les cellules haploïdes (Thacker, 1973). Une manosonication (tampon de pH 7,0, 117  $\mu$ m, 20 kHz, 200 kPa) de *C. sakazakii* a montré que cette bactérie était 1,6 fois plus résistante lors de la phase stationnaire que lors de la phase exponentielle (Arroyo Casabona *et al.*, 2011).

### 1.4.3.1.5. L'impact des US sur la fermentation

Les effets létaux des US sur les microorganismes ont fait l'objet de nombreuses recherches depuis la fin des années 90, mais l'utilisation des US pour promouvoir ou contrôler leur activité est beaucoup plus récente. En effet, l'application des US à faible puissance s'est avérée favoriser la croissance des cultures cellulaires et de leurs produits (Wood, Aldrich et Ingram, 1997; Schläfer *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2003; Lanchun, Bochu, Zhiming, *et al.*, 2003; Jomdecha, 2006; Sulaiman *et al.*, 2011; Pulidindi *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2015), cependant, les US à haute puissance se sont également avérés perturber les cellules, les inactivant ou affectant leur productivité (Anderson, 1953; Radel *et al.*, 2000; Tsukamoto, Constantinoiu, *et al.*, 2004; Tsukamoto, Yim, *et al.*, 2004; Guerrero, Tognon et Alzamora, 2005; Ma *et al.*, 2008; Vivek, Subbarao et Srivastava, 2016).

#### 1.4.3.1.5.1. Impacts sur la fermentation alcoolique

Anderson (1953) et Jomdecha (2006) ont étudié les effets du traitement direct par US sur les fermentations de *S. cerevisiae*. Anderson a découvert que la production de dioxyde de carbone diminuait après que le milieu de fermentation avait été soumis aux US, en particulier lorsque le milieu de fermentation contenait des cellules plus jeunes. La vitesse de fermentation diminuait dans tous les cas, même avec la même énergie fournie, mais avec des cycles de traitements différents. Une ultrasonication plus courte mais plus intense entraînant une plus grande inhibition du taux de fermentation. Les US semblaient avoir un effet plus marqué sur les cellules plus jeunes que les cellules plus anciennes. Également, l'application d'une faible intensité de 20 à 30 kHz a induit la stimulation de l'activité de *S. cerevisiae* et a amélioré la production d'éthanol. Une fréquence optimale, de 25 kHz, a augmenté la teneur en éthanol d'environ 3,6 % (Klomklieng et Prateepasen, 2011). Le prétraitement par US à 40 kHz était également utilisé lors de la production de bioéthanol. Cette production est le résultat d'une saccharification et une fermentation de maïs en utilisant une souche de *S. cerevisiae* à différentes températures et temps de sonication. Une concentration finale en éthanol de 11,15%, significativement plus élevée que celle des contrôles a été obtenue (Nikolic *et al.*, 2010).

Dans une autre étude, Pulidindi *et al.*, (2012) ont signalé une accélération de la fermentation alcoolique à partir de glucose par la levure *S. cerevisiae* à 20 et 30 °C et une solution de glucose à 20 et 40% dans un ballon de 100 mL et un volume utile de 50 mL, à

## 1. Revue bibliographique

---

laquelle 1 g de levure a été ajouté. Des US indirects ont été appliqués à 40 kHz et 120 W, dans un bain à US d'un volume de 4 L générant des US continus de l'ordre de 30 W/L. Les traitements par US étaient effectués sans agitation, tandis que les traitements de contrôle ont été agités à 1000 tr/min. Une accélération des fermentations a été observée pour les différents traitements par US. Il a été de même constaté que les US induisaient une meilleure agitation. En conséquence, l'éthanol pourra être éliminé de la surface de la levure, ainsi que le CO<sub>2</sub> du milieu de fermentation. Des changements de perméabilité de la membrane pourront être aussi observée ainsi qu'une augmentation du transfert de masse (Pulidindi *et al.*, 2012). Le prétraitement par US augmentait efficacement les teneurs en glucose et en maltose après liquéfaction de 15,71% et 52,57%, respectivement, par rapport à l'échantillon témoin non traité dans des conditions optimales de sonication (5 min, 60 °C). Le prétraitement par US a par conséquent amélioré la production de bioéthanol au cours du traitement ; le contenu en bioéthanol a été augmenté de 10,89% (Pejin, Gruji et Markovi, 2012).

Une étude récente a montré la diminution de production d'éthanol suite au traitement par US (Huezo, Shah et Michel, 2019). Le calcul des modules observables externes et intraparticulaires dans une gamme de conditions indique qu'aucune limitation de transfert de masse externe ou intraparticulaire ne devrait exister pour le transfert de masse de glucose, d'éthanol ou de dioxyde de carbone. Les fermentations de glucose en éthanol par *S. cerevisiae* ont été réalisées à différentes intensités d'US pour examiner les effets du traitement sur l'absorption du glucose, la production d'éthanol, la population de la levure et sa viabilité. Trois traitements ont été appliqués : l'application directe à des intensités de 23 et 32 W/L, et l'application indirecte (1,4 W/L). Ces traitements ont été comparés aux cultures non traitées. Les US directs et indirects ont eu des effets négatifs sur les performances et la viabilité de la levure et ont réduit les taux d'absorption de glucose et de production d'éthanol (Huezo, Shah et Michel, 2019).

### 1.4.3.1.5.2. Impacts sur la fermentation lactique

L'amélioration de la teneur en alcool n'était pas le seul effet observé suite au traitement par US. Ces derniers étaient aussi appliqués dans le domaine de fermentations lactiques. L'efficacité des US à basse fréquence a été démontrée dans la stimulation des probiotiques dans le lait (Nguyen, Lee et Zhou, 2009, 2012). Les auteurs ont signalé une amélioration de l'hydrolyse et de la transgalactosylation du lactose par les bi-dobactéries, ainsi qu'une réduction du temps de fermentation jusqu'à 30 min, en fonction de la souche probiotique. En particulier, les échantillons traités aux US ont montré des concentrations plus faibles de cellules probiotiques viables au début de la fermentation par rapport au contrôle, alors qu'aucun changement significatif n'a été observé dans les concentrations finales à la fin de la fermentation (Nguyen, Lee et Zhou, 2009). Dans une autre étude, une augmentation de la viabilité des probiotiques (*Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp.) a été rapportée par rapport au témoin dans le cas du lait de soja fermenté (Yeo et Liong, 2013). L'activation d'une culture mixte de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* à 84 W a été effectuée par Barukčić *et al.*, (2015). Une concentration supérieure d'environ 1 log par rapport aux inoculum non traités a été observée, ce qui a entraîné une réduction du temps de fermentation jusqu'à 30 min. En plus, il a été démontré que l'application d'US au cours de la fermentation améliore l'activité  $\beta$ -galactosidase des probiotiques, ce qui se traduit par la



## 1. Revue bibliographique

---

production d'oligosaccharides favorables à la santé dans le lait fermenté (Nguyen, Lee et Zhou, 2012), et par une amélioration des activités de bioconversion par l'isoflavone dans le lait de soja (Yeo et Liong, 2011). Bien que la stimulation de l'activité enzymatique due à la sonication soit un processus mal compris, une augmentation du taux de transfert de masse des réactifs au site actif semble être le facteur le plus important.

### 1.4.3.2. Les champs électriques pulsés

L'étude des effets du courant électrique sur les cellules biologiques a été menée peu de temps après la disponibilité de l'électricité dans le commerce. À la fin du XIXe siècle, Prochownick et Spaeth, (1890) ont étudié pour la première fois les effets bactéricides du courant électrique continu et alternatif. Il a été constaté qu'un courant continu de 300 mA n'inactivait pas *Staphylococcus aureus* en suspension (Prochownick et Spaeth, 1890), mais induisait des variations de l'acidité dans le milieu traité.

Par la suite, les mécanismes de base et les effets des CEP sur les cellules biologiques ont été explorés. Les recherches ont divergé en deux domaines incluant les effets réversibles et irréversibles de l'électroporation. Neumann et Rosenheck, (1972) ainsi que Zimmermann *et al.*, (1974, 1976) ont étudié le potentiel de réalisation d'une perméabilité réversible au niveau cellulaire pour des applications en bio-ingénierie. D'autres groupes se sont concentrés sur les effets irréversibles et mortels à des fins de préservation. Dans les années 1980, des modèles mathématiques ont été développés pour décrire l'inactivation microbienne par les CEP, y compris l'intensité du champ électrique et la durée du traitement (Hülshager et Niemann, 1980; Hülshager, Pote et Niemann, 1983).

#### 1.4.3.2.1. L'électroporation

L'application des CEP de forte intensité et d'une durée allant de quelques microsecondes à quelques millisecondes peut provoquer une perméabilisation temporaire ou permanente des membranes cellulaires. Ce phénomène est décrit sous le terme de « électroporation » ou « électro-perméabilisation ». Les effets des CEP sur les biomembranes ont fait l'objet d'études approfondies, vu que leur utilisation a suscité un vif intérêt dans plusieurs domaines scientifiques tels que la biologie cellulaire, la biotechnologie, la médecine, ou la technologie alimentaire (Zimmermann, 1986; Palaniappan et Sastry, 1990; Ho et Mittal, 1996; Prasanna et Panda, 1997).

## 1. Revue bibliographique

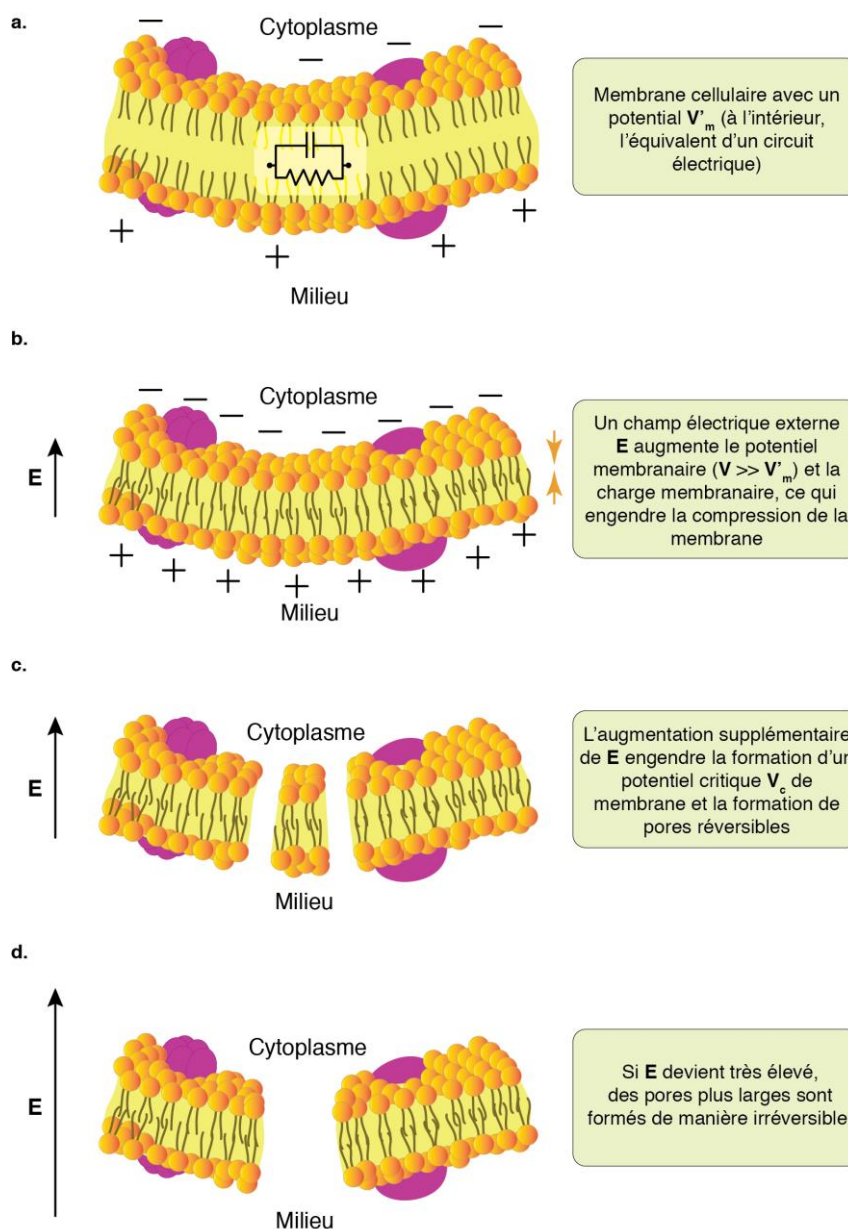


Figure 1.12. Electroporation des membranes cellulaires exposées aux CEP. Adaptée de (Roohinejad *et al.*, 2018).

L'électroporation consiste en la formation de pores au niveau de la membrane cellulaire et des organites. Selon l'intensité des CEP, l'électroporation peut induire la formation de pores transitoires ou permanents provoquant une électroporation respectivement réversible ou irréversible, comme décrit sur la figure 1.12 (Zimmermann, 1986; Rols *et al.*, 1990; Tsong, 1991; Weaver et Chizmadzhev, 1996). La présence de pores transitoires, qui se referment après la suppression du champ électrique, assure la survie des cellules receveuses stimulées électriquement. Dans ces conditions, l'électroporation est un outil précieux pour injecter des molécules exogènes telles que des médicaments, des protéines, de l'ARN ou de l'ADN dans des cellules sans détériorer les diverses fonctions cellulaires. Au contraire, lorsque les CEP sont appliqués à une intensité plus élevée, l'électroporation est si intense qu'elle devient irréversible, même la désintégration de la membrane cellulaire et d'autres structures cellulaires pourront être observées. Dans ces circonstances, les CEP causeraient des dommages

## 1. Revue bibliographique

---

permanents à la membrane cellulaire ou une lyse cellulaire, ce qui est la base du succès des traitements par CEP en tant qu'une nouvelle méthode de traitement et de préservation des aliments pour l'industrie alimentaire.

Outre l'électroporation, les CEP peuvent provoquer une électrofusion des cellules (Chang *et al.*, 1992). Ce processus consiste en la fusion ou la coalescence de deux cellules ou plus en une seule grande cellule. Il s'est révélé être un outil pertinent en génie génétique qui aboutira à une sélectivité et un contrôle efficace du processus de fusion, la prévision des conditions de fusion et des rendements élevés en hybrides viables.

### 1.4.3.2.2. Les sources de courant

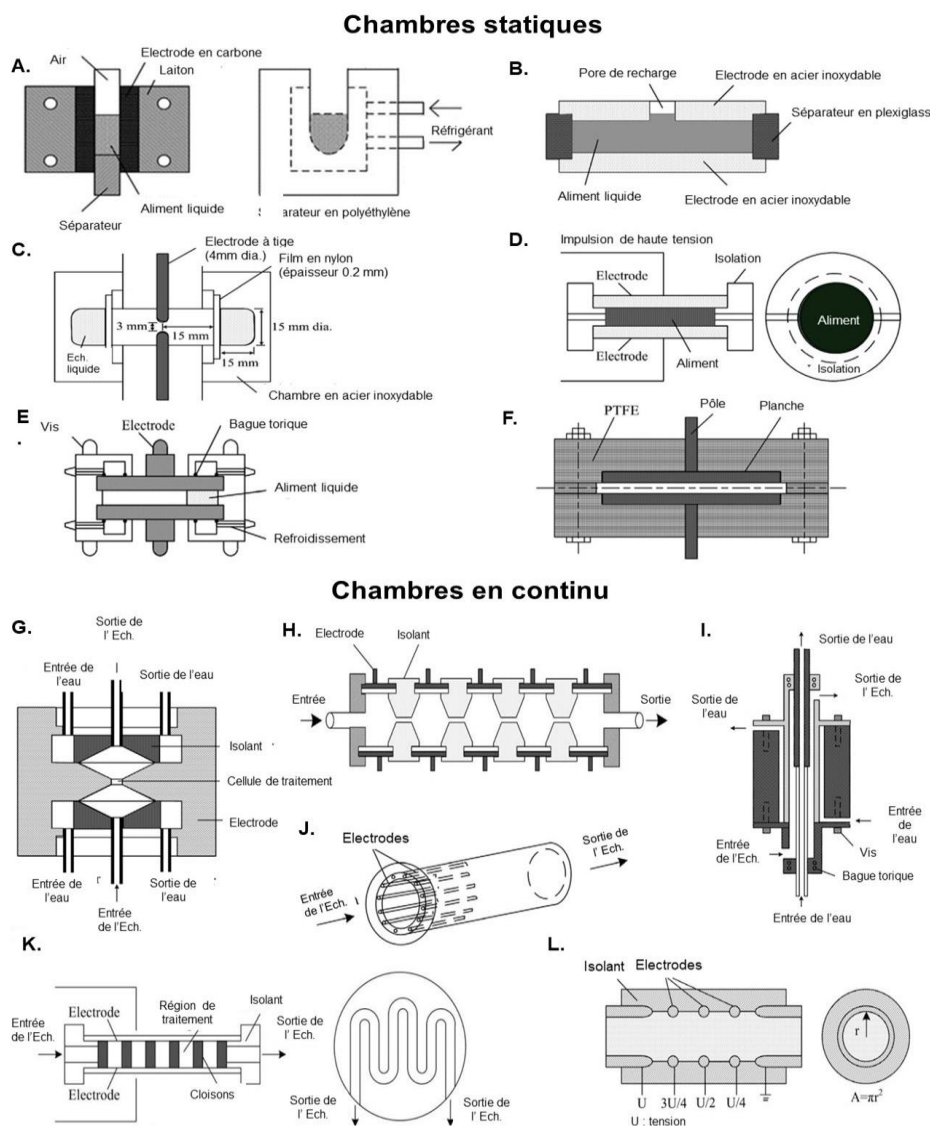
Des impulsions de haute tension sont fournies au système via un générateur d'impulsions haute tension qui fournira l'intensité, la forme, et la durée des impulsions requises. L'alimentation haute tension du système peut être soit une source ordinaire de courant continu, soit une charge de condensateur avec des entrées de courant alternatif de haute fréquence fournissant une charge de commande avec des débits répétitifs supérieurs à ceux de l'alimentation continue (Zhang *et al.*, 1996).

Le réseau de formation d'impulsions le plus simple est un circuit RC (résistance-capacité) dans lequel une alimentation charge un condensateur capable de délivrer son énergie stockée à une charge résistive (chambre de traitement) en quelques microsecondes, par activation d'un commutateur (Góngora-Nieto *et al.*, 2002). La puissance totale du système est limitée par le nombre de fois qu'un condensateur peut être chargé et déchargé dans un temps donné. Le deuxième composant du réseau de formation d'impulsion est le dispositif de commutation de haute tension nécessaire pour décharger l'énergie stockée à travers le circuit instantanément.

### 1.4.3.2.3. Les chambres de traitement

La chambre de traitement est l'un des composants les plus importants et les plus compliqués du système de traitement. Plusieurs différentes conceptions ont été développées à travers le temps. La haute tension délivrée par l'alimentation est appliquée au produit situé entre une paire d'électrodes. Le rôle de la chambre de traitement est de conserver la totalité du produit pendant le traitement. Également, l'uniformité du processus dépend fortement du « design » de la chambre de traitement. Elles peuvent fonctionner selon un système discontinu ou continu. Les systèmes batch étaient les premiers conçus pour la manipulation de volumes statiques d'aliments solides ou semi-solides (Sale et Hamilton, 1967; Dunn et Pearlman, 1987; Mizuno et Hori, 1991).

Les modèles statiques décrits en figure 1.13 étaient une base pour l'évolution des chambres continues qui fourniraient une circulation avantageuse de l'échantillon pour une utilisation efficace dans les applications industrielles. Des exemples de modèles de chambres de traitements continus réussis et efficaces sont : le cylindre concentrique, le cône concentrique, et le co-champ. La figure 1.13 regroupe de même d'autres modèles de chambres de traitements en continu.



**Figure 1.13. Schéma adapté des différents modèles de chambres de traitement statiques et en continu. A. Cellule de traitement conçue par Sensoy, Zhang et Sastry, (1997) B. Dunn et Pearlman, (1987). Cellule de traitement coaxiale C. Pizzichemi, (2007) D. Morshuis *et al.*, (2002). E. Cellule de traitement avec cloisons conçue par Zhang *et al.*, (1995) F. Modèle modulaire par Mastwijk et Bartels, (2000) G. Sale et Hamilton, (1967) H. Pearlman et Diego, (1987) I. Qin *et al.*, (1998) J. Amiali *et al.*, (2004) K. Matsumoto *et al.*, (1991) L. Zhang, Barbosa-Cánovas et Swanson, (1995).**

#### 1.4.3.2.4. Les facteurs agissant sur les traitements CEP

Des facteurs variables peuvent affecter positivement ou négativement l'efficacité de la perméabilisation des membranes.

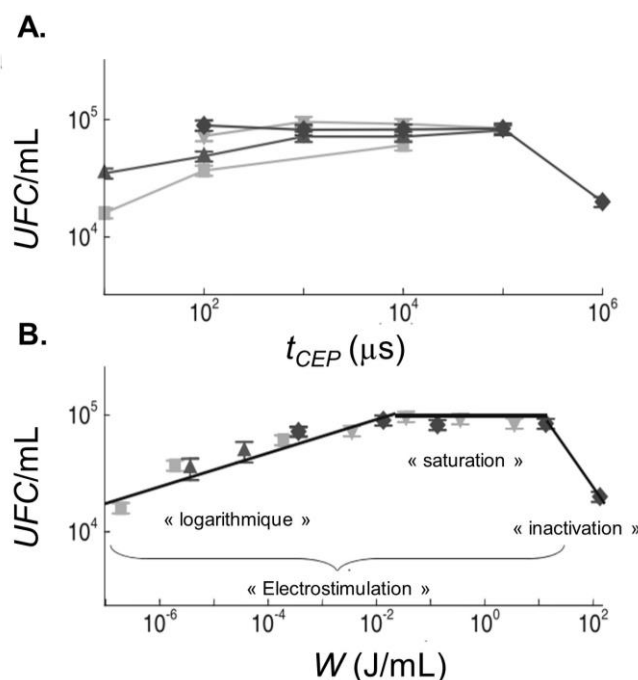
##### 1.4.3.2.4.1. L'intensité des champs électriques appliquée

L'intensité des CEP est un facteur clé à prendre en considération lors de l'application des CEP. Une application externe d'un champ électrique avec une intensité  $E$  supérieure à l'intensité critique, favorise la création des pores dans la membrane cellulaire comme décrit précédemment (paragraphe 1.4.3.2.1.). Spécifiquement, dépendamment du but du traitement des microorganismes, des intensités élevées pourront induire l'inactivation des microorganismes (Góngora-Nieto *et al.*, 2002; Zhong, Chen et Wang, 2005; Timmermans *et*

## 1. Revue bibliographique

*al.*, 2014), alors que des intensités faibles pourront au contraire induire la stimulation cellulaire (Araújo *et al.*, 2004; Petrofsky *et al.*, 2006; Mattar *et al.*, 2013, 2014; Mota *et al.*, 2018).

Il a été démontré que l'électrostimulation des cellules dépend de l'énergie appliquée au cours du traitement (Mattar *et al.*, 2014). La figure 1.14 montre que l'électrostimulation passe par plusieurs stades, ou elle augmente d'une manière logarithmique en fonction de l'augmentation de l'énergie appliquée pour atteindre un stade de saturation. A ce stade, la même réponse d'électrostimulation est obtenue malgré l'augmentation de l'énergie jusqu'à ce que l'énergie devient assez forte pour l'inactivation cellulaire (Mattar *et al.*, 2014).



**Figure 1.14. UFC par millilitre en fonction du temps de traitement par CEP (a) et la consommation d'énergie spécifique  $W$  (b) pour différentes intensités de champ électrique ( $E = 0$  à 2 000 V/cm) et  $t_f = 24$  h:  $E$  (V/cm) = 20 (carré noir), 100 (triangle noir), 1 000 (triangle gris inversé), 2000 (losange noir), adaptée de Mattar *et al.*, (2014).**

### 1.4.3.2.4.2. Le temps de traitement

La durée du traitement est définie en fonction de la durée de la largeur de l'impulsion et du nombre d'impulsions appliquées. Les traitements par CEP sont généralement appliqués sous forme d'impulsions courtes pour éviter un chauffage excessif ou des réactions électrolytiques indésirables (Góngora-Nieto *et al.*, 2002). Les temps de repos sont nécessaires pour le refroidissement de la matière traitée. De même, l'efficacité du traitement dépend de l'énergie fournie au cours de la durée totale du traitement. L'énergie à son tour est proportionnelle au temps de traitement.

### 1.4.3.2.4.3. La température du traitement

La température affecte l'efficacité du traitement électrique et la perméabilisation cellulaire. Une élévation importante de la température peut avoir un impact négatif sur le traitement. Elle affectera la conductivité du milieu et donc l'amplitude du champ électrique. Ainsi, les conditions de traitements optimales doivent être de sorte à minimiser les réchauffements



## 1. Revue bibliographique

---

(Wouters et Smelt, 1997). De fortes fréquences et de longues impulsions favorisent l'élévation de la température (Raso *et al.*, 2000).

### 1.4.3.2.4.4. *La conductivité électrique*

La conductivité électrique est un facteur clé pour le bon déroulement du traitement par CEP. Elle varie selon la température du milieu ; une hausse de la température peut conduire à une élévation de la conductivité électrique. D'un point de vue énergétique, un milieu ayant une conductivité électrique importante demande beaucoup plus d'énergie lors du passage du courant.

Les facteurs physiques et chimiques des traitements liés directement à la méthode appliquée ne représentent pas les seuls éléments à prendre en considération. Cependant, les propriétés des microorganismes jouent un rôle essentiel dans l'efficacité du traitement.

### 1.4.3.2.4.5. *Le type de microorganismes*

Des paramètres propres aux microorganismes ciblés peuvent affecter énormément leur sensibilité aux traitements par CEP. Un simple exemple, les bactéries Gram positif sont plus résistantes au traitement par CEP que les cellules Gram négatif (Sale et Hamilton, 1967).

D'un autre côté, les levures sont plus sensibles aux champs électriques que les bactéries Gram positif puisqu'elles ont une taille plus importante. Également, elles peuvent être plus résistantes que les bactéries Gram négatif (Mohamed et Eissa, 2012; Shamtsyan, 2012). La structure des parois des levures est assez complexe, les liaisons S-S assurent sa stabilité contre les altérations créées par les CEP.

### 1.4.3.2.4.6. *La concentration des microorganismes*

Le processus d'électroporation réversible dépend de la concentration des cellules dans le milieu. Pour une concentration traitée élevée, la refermeture des pores membranaires serait moins efficace que celle d'une faible concentration (Molinari, Pilosof et Jagus, 2004). Également, l'effet de la concentration microbienne sur les résultats du traitement par CEP pourrait être lié au regroupement des cellules particulièrement dans les zones à faible intensité de champ électrique (Zakhem *et al.*, 2006).

### 1.4.3.2.4.7. *La phase de croissance des microorganismes*

La phase de croissance des microorganismes est un facteur important à prendre en compte lors du traitement par CEP (McDonald *et al.*, 2000). Mattar *et al.*, (2013) ont observé une amélioration notable de la cinétique de fermentation lors de la stimulation des cellules de *S. cerevisiae* par CEP pendant la phase de latence. De plus, il a été noté que l'électroporation était plus efficace lorsque le traitement était appliqué pendant les premières heures de fermentation qu'après 24 h. Il semble que les cellules sont devenues moins sensibles à l'électroporation pour une fermentation préliminaire plus longue.

La création de stress cellulaire par CEP est une méthode appliquée depuis longtemps en biologie, biotechnologie, et médecine (Neumann, 1992; Neumann, Sowers et Jordan, 2002; Funk, Monsees et Özkucur, 2009). Cependant, l'application de cette méthode dans l'industrie alimentaire est relativement récente (Crouzier *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2009; Tanino *et al.*, 2012a). La compréhension de cette méthode nous permet d'être conscient que des changements minimes au niveau des paramètres externes aboutissent à des effets distincts sur les processus métaboliques des microorganismes. Ainsi, l'inactivation ou la stimulation des cellules dépend de la "dose" du stress appliqué, soit on cherche une électroporation irréversible et la mort

## 1. Revue bibliographique

---

cellulaire, soit une électroporation réversible et la stimulation ou l'extraction de biomolécules d'intérêt. Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet réversible stimulateur. Dans ce qui suit nous détaillerons l'état actuel des connaissances sur l'effet stimulateur induit par CEP.

### 1.4.3.2.5. La stimulation des levures

La stimulation des levures par CEP peut avoir différentes fins industrielles. Une telle stimulation pourrait être utilisée soit pour viser l'utilisation des substrats par les levures, soit la croissance cellulaire ou les activités fermentaires des microorganismes.

#### 1.4.3.2.5.1. Les impacts sur la consommation des substrats

La stimulation des levures peut être une méthode pour améliorer l'efficacité de consommation du substrat et l'accumulation d'éléments importants tels que le magnésium (Pankiewicz et Jamroz, 2010), le zinc (Pankiewicz et Jamroz, 2011), et le sélénium (Pankiewicz *et al.*, 2006; Pankiewicz et Jamroz, 2008). Suite à un traitement d'intensité de 1,25 à 3,25 kV/cm, une augmentation de 62% de la biosorption de l'uranium dans des levures a été observée. Ainsi, l'application d'impulsions brèves et intenses pourrait améliorer la biosorption des métaux toxiques provenant des flux d'eaux usées (Bustard *et al.*, 1996). En effet, Mattar *et al.*, (2013) ont noté l'accélération de la consommation des sucres par *S. cerevisiae* suite à leur exposition à de faibles intensités de CEP.

#### 1.4.3.2.5.2. Les impacts sur la croissance cellulaire

L'amélioration de la croissance cellulaire ou de l'activité métabolique des levures est attendue suite aux traitements par de faibles intensités de CEP. Une augmentation de la concentration d'une levure recombinante *S. cerevisiae* (NCYC869-A3 / pVK1.1) suite à de faibles intensités de champ électrique a été noté (Castro *et al.*, 2005). Une concentration de biomasse supérieure de près de 3 fois par rapport au témoin, et une phase de latence plus courte pour les suspensions traitées ont été observées. Dans une autre étude, une augmentation de la croissance de 100% à 0,85 kV/cm a été observée par rapport au témoin (Fologea, Vassu-Dimov, Stoica, Csutak et Radu, 1998). De même, les levures de *S. cerevisiae* stimulées, ont montrées une augmentation de l'accumulation de la biomasse (Mattar *et al.*, 2013).

#### 1.4.3.2.5.3. Les impacts sur l'activité fermentaire

Les travaux de recherche sur la fermentation portent sur la reproduction directe du processus classique de la fermentation pour la production d'éthanol dans des récipients généralement entièrement exposés à des champs extérieurs.

La stimulation de la production d'alcool par l'induction de CEP a été décrite. Une augmentation de la production d'éthanol de 25 à 35% a été observée après l'exposition de la souche *Kluyveromyces marxianus* à des impulsions de champs électriques uniques de 2,4 kV/cm sur un milieu contenant du lactose. Cette production double si la croissance se fait dans les mêmes conditions de traitement mais dans un milieu lactose supplémenté de 1 mM de MnCl. Par la suite, il a été démontré que la production peut augmenter de 40% sur un milieu de cellobiose (Simpson *et al.*, 1995). Également, les effets du courant électrique sur les caractéristiques de la fermentation de la levure ont été étudiés. Lorsqu'un courant continu ou un courant alternatif de 100 mA ont été appliqués aux cultures, des augmentations

## 1. Revue bibliographique

---

significatives de la croissance cellulaire et des taux de production d'alcool se produisaient. Les teneurs en alcools supérieurs, esters et acides organiques des cultures traitées étaient différentes du témoin (Naksnishi *et al.*, 1998). Une fermentation alcoolique du moût de « Sauvignon blanc » par *S. cerevisiae* a été assistée par un courant électrique continu faible de 1,3, 7,7 et 30  $\mu\text{A}$ . Une stimulation de la croissance cellulaire, de la production d'éthanol, de glycérol, et d'acétaldéhyde a été observée (Berovic, Potocnik et Strus, 2008). Outre la production d'éthanol, l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques des raisins durant l'étape de la macération-fermentation en rouge a été étudiée. Les pré-traitements par CEP améliorent l'intensité de la couleur, la concentration en anthocyanes et l'indice polyphénolique total durant la fermentation en rouge (López *et al.*, 2008b, 2008a; El Darra *et al.*, 2013).

Les effets de la fréquence de champs électriques modérés (CEM) sur la cinétique de croissance microbienne et la production de bactériocine (Lacidine A) de *Lactobacillus acidophilus* OSU 133 pendant la fermentation ont été étudiés. Les traitements de fermentation suivants ont été comparés : conventionnel (pendant 40 h), CEM (1 V/cm, pendant 40 h), combinaison de CEM (1 V/cm, pendant les 5 premières heures) et conventionnelle (pendant 35 h) à différents niveaux de fréquence (45, 60, et 90 Hz), à 30 °C et la fermentation contrôlée (classique) à 37 °C. A 30 °C, les traitements par CEM ont aboutis à une phase de latence plus courte que celle de la fermentation conventionnelle. Aucune réduction de la phase de latence n'a été observée pour l'application d'onde de 60 Hz de haute fréquence. Cependant, une augmentation significative de la production de bactériocine à cette fréquence a été notée. Ces résultats ont été observés lorsque les traitements ont été effectués au début de la phase de croissance (Loghavi, Sastry et Yousef, 2015).

Le procédé de fermentation en batch, inoculé par des levures vinicoles (*S. cerevisiae* Actiflore F33) traitées par CEP, a été étudié par Mattar *et al.*, (2015). Le traitement a été appliqué aux suspensions aqueuses de levures aux intensités  $E = 100$  et  $6000$  V/cm en utilisant le même protocole de traitement (nombre d'impulsions  $n = 1000$ , durée d'impulsion  $t_i = 100$   $\mu\text{s}$  et temps de répétition des impulsions  $\Delta t = 100$  ms). La conductivité électrique augmentait pendant et après le traitement, ce qui reflétait l'électroporation cellulaire. Ensuite, la fermentation a été conduite pendant 150 h dans un incubateur à 30 °C. L'électrostimulation se révélait par l'amélioration des caractéristiques de la fermentation, augmentant ainsi le métabolisme de la levure. A la fin de la phase de latence ( $t = 40$  h), la consommation de fructose dans les échantillons avec inoculum activé électriquement dépassait celle des échantillons de contrôle d'environ 2,33 fois pour  $E = 100$  V/cm et de 3,98 pour  $E = 6000$  V/cm. À la fin de la phase logarithmique (120 h de fermentation), une réduction de masse d'environ 30% était atteinte dans les échantillons contenant des inocula traités aux CEP ( $E = 6000$  V/cm), alors que l'obtention de cette réduction dans les fermentations contrôlées nécessite 20 h supplémentaires.

Les différents effets des traitements sont observés et rapportés sans toutefois en savoir la raison derrière. Cependant, diverses hypothèses et explications ont été proposées par les chercheurs. De même, il est important de noter que ces effets sont distincts d'une étude à l'autre ce qui rend l'analyse et la comparaison des différentes études assez complexes. Normalement, tous ces effets sont directement liés aux phénomènes d'électroporation et au stress cellulaire



## 1. Revue bibliographique

---

induits suite aux traitements électriques. Les explications et hypothèses déjà retrouvées dans la littérature seront citées plus bas.

### 1.4.3.2.6. Les mécanismes cellulaires induits par CEP

Les hypothèses relatives aux mécanismes cellulaires affectés par les CEP ont été résumées et regroupées ci-dessous :

- Suite à l'étude de la perméabilité et l'élasticité des membranes, la perméabilité est reliée au phénomène d'électroporation et la diminution de l'élasticité membranaire, et est expliquée par la déstabilisation du cytosquelette d'actine. Cette déstabilisation entraînera une perte de l'intégrité de la membrane et une morphologie cellulaire aberrante (Dutta, Asmar et Stacey, 2015). Au niveau de la membrane cellulaire selon Perez *et al.*, (2007), le système redox pourrait être affecté et ainsi altérer le transport ionique des substrats. Également, un regroupement de canaux ioniques ou de récepteurs peut se produire dans la membrane cellulaire (Funk, Monsees et Özkucur, 2009). Une activation des protéines membranaires pourrait de même avoir lieu suite à l'application d'un courant électrique (Castro, Teixeira et Vicente, 2005).
- Les changements observés au niveau cellulaire sont expliqués par les altérations du cycle cellulaire. Les effets de CEP peuvent être principalement dus aux déplacements d'ions. L'ADN est une structure intracellulaire fortement chargée. Ses structures linéaires, pliées et sa proximité de la membrane nucléaire pourraient le rendre sensible aux effets de CEP. Si ces effets se produisent, des dommages au niveau de l'ADN peuvent être observés, ainsi que des modifications et des anomalies du cycle cellulaire (Stacey *et al.*, 2003). Ceci suggère que les cellules survivantes s'accumulent à un point du cycle cellulaire avant la mitose, potentiellement pour réparer les dommages induits avant de rentrer dans le cycle cellulaire. De manière surprenante, les cellules ne rentrent dans la mitose qu'une semaine après leur exposition aux CEP. Il est peu probable que les cellules soient maintenues à G1/S car les cellules transformées ont un point de contrôle G1/S défectueux. Il est possible qu'elles se trouvent au stade G0. Par conséquent, une période relativement longue peut s'écouler avant que les cellules n'atteignent la mitose par rapport aux cellules maintenues au stade G2/M qui peuvent entrer rapidement dans la mitose (Stacey *et al.*, 2003). Le blocage au stade G2/M est cependant une réponse cellulaire universelle aux agents endommageant l'ADN. D'autre part, il a été rapporté que l'accélération des voies de transduction du signal qui conduisent la cellule au « point de départ » du cycle cellulaire puisse avoir lieu en diminuant la phase G1 (Araújo *et al.*, 2004; Rocha-Leão *et al.*, 2005). Le passage précoce de la levure de la phase G1 à la phase S a été activé. Cela signifiait que la durée du cycle cellulaire serait inférieure au temps nécessaire à la duplication, produisant ainsi un nombre plus élevé de cellules mais avec une taille cellulaire plus petite (Araújo *et al.*, 2004; Rocha-Leão *et al.*, 2005). De même, l'expression des gènes oxydatifs peut avoir lieu comme réponse au stress (Tanino *et al.*, 2012b).
- Rocha-Leão *et al.*, (2003) ont souligné que le métabolisme du glycogène est associé à la viabilité cellulaire sous stress, et le déclenchement de la répression du glucose est en corrélation avec l'absorption du glucose et le flux glycolytique de la cellule. La stimulation électrochimique favorise un déséquilibre entre l'absorption du glucose et son flux

## 1. Revue bibliographique

---

catabolique. Ainsi, à faible vitesse de croissance, le glycogène retient le glucose intracellulaire non oxydé dans les cellules. D'autres explications sont basées sur l'électro-activation de certains systèmes enzymatiques ou des voies métaboliques liées à des processus au niveau de la membrane cellulaire (Fologea *et al.*, 1998). Une étude récente rapporte l'effet de l'électrostimulation sur la voie de production de l'éthanol et l'effet sur les particules chargées qui peuvent être éloignées des voies oxydatives (Jiang *et al.*, 2019).

### 1.5. Conclusions et positionnement du sujet

L'état des connaissances réalisées dans ce chapitre permet de comprendre que l'optimisation de la fermentation nécessite la maîtrise de plusieurs paramètres : le milieu fermentaire, le ferment, et le procédé de fabrication. Les études réalisées lors de cette thèse s'intéressent spécifiquement à la fermentation des pommes comme voie massive de valorisation de ce produit. En particulier, les études se focalisent à une fermentation dans le but de l'élaboration du cidre à partir de pommes libanaises.

En parlant ainsi de milieu fermentaire, on parlera des pommes. L'importance de la matière première réside en sa contribution à la formation d'un produit fermenté de qualité. Les sucres, les composés phénoliques, et les acides sont les composants majeurs affectant la qualité du cidre. Des quantités bien déterminées sont requises pour la formation des arômes et des saveurs favorables. Malheureusement, aucune donnée sur les pommes libanaises et leur potentiel à la production du cidre n'a été retrouvée dans la littérature.

En outre, le ferment joue un rôle important lors de la fermentation. La fermentation alcoolique est guidée par des réactions chimiques et métaboliques d'une levure. Une levure est constituée d'un assemblage de différentes voies métaboliques, de réactions cellulaires, d'expression de gènes menés qui sont dirigés par les conditions et les paramètres variables de son milieu. Ces variations peuvent favoriser le déclenchement d'une voie métabolique en faveur d'une autre : mode respiratoire ou fermentaire, l'expression des gènes d'oxydation ou pas et parfois le blocage de la mitose pour la défense et la survie. Alors basées sur ses voies métaboliques, certaines levures pourront former des produits de fermentation différents des autres, contribuant à la formation des arômes du produit fermenté et affectant aussi la vitesse de fermentation.

Enfin, le procédé fermentaire et son déroulement affectent la fermentation. Des méthodes physiques telles que les CEP et les US pourront être ajoutées à ce procédé engendrant un stress cellulaire aux levures. L'impact de ces méthodes sur les microorganismes dépend de plusieurs facteurs surtout de la « dose » de stress engendré. Deux réponses s'imposent : l'inactivation à des hautes intensités, et la stimulation des microorganismes à des intensités de traitement modérées. La maîtrise de ces traitements est alors cruciale pour avoir des impacts en faveur de la fermentation ou plutôt avoir les impacts désirés.

Dans ce contexte, les enjeux de ce travail sont dans un premier temps d'étudier le potentiel fermentaire des pommes libanaises et leur valorisation en les transformant en cidre. Dans un second temps, nos études visent à évaluer l'impact des technologies émergentes de CEP et d'US sur la fermentation des pommes pour la production du cidre.

## **1. Revue bibliographique**

---

Afin de répondre à cette problématique, différents objectifs scientifiques ont été fixés :

- 1- L'isolement et l'identification d'une souche indigène de levure présente lors de la fermentation spontanée du jus de pommes libanais ;
- 2- L'étude des propriétés physico-chimiques des pommes libanaises et l'évaluation de leur capacité à produire du cidre ;
- 3- L'évaluation de la capacité fermentaire de la levure isolée pour la production du cidre ;
- 4- L'étude de l'effet des technologies émergentes de CEP et d'US sur la fermentation.

L'objectif technologique de ces études réside en l'étude de la faisabilité d'implémentation des technologies testées (CEP et US) dans les processus fermentaires actuels.

---

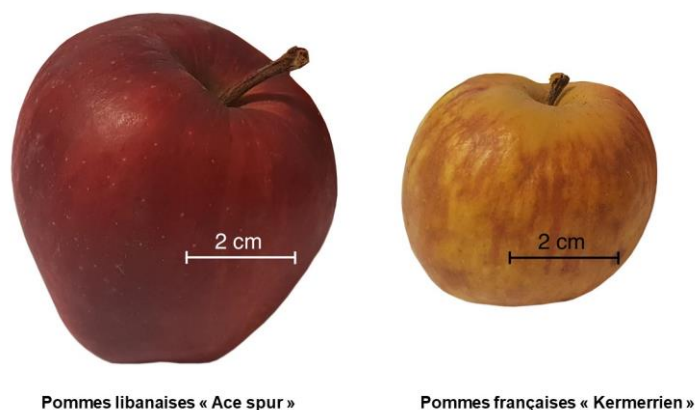
## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.1. Les matières premières

Deux variétés de pommes « Ace spur » et « Kermerrien » ont été utilisées durant les différentes études (**Figure 2.1**). La variété « Ace spur » a été fournie de la région de « Bqaatouta » Keserwan (Liban). Cette variété a été choisie en raison de sa grande disponibilité sur le marché libanais et du fait qu'aucune variété de pomme spécifique destinée à la production de cidre n'existe au Liban. 300 kg de cette variété de pommes ont été utilisés lors de nos essais au Liban et en France. Des échantillons ont été choisis de différentes caisses afin d'assurer l'homogénéité des échantillons lors des différents essais.

La variété « Kermerrien » a été procurée par l'IFPC (Institut français des productions cidricoles) de la ville de « Le Rheu » (France). Les pommes ont été apportées au cours de la même période de récolte (saison 2017/2018) afin de minimiser les erreurs dues à la conservation et à la maturation des pommes. Elles étaient conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation.



**Figure 2.1.**Aspects morphologiques des deux variétés de pommes étudiées.

### 2.2. Les méthodes analytiques

#### 2.2.1. Détermination des propriétés pomologiques des pommes

##### 2.2.1.1. Détermination de la masse

La masse (g) des fruits a été mesurée en utilisant une balance de précision monobloc Mettler Toledo PB3002-S (Aldrich, Allemagne).

##### 2.2.1.2. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau des tranches de pomme a été déterminée à l'aide d'un dessiccateur infrarouge (Sartorius MA150). L'échantillon est chauffé à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.2.1.3. Détermination des propriétés de taille et de forme

Les mesures des diamètres polaire ( $L$ ), de suture ( $W$ ) et équatorial ( $T$ ) (**Figure 2.2.**) ont été réalisées à l'aide d'un micromètre de mesure Digital Vernier Caliper Electronic (Athol, MA, USA). Elles ont permis de calculer différents paramètres comme suit :

- L'élongation

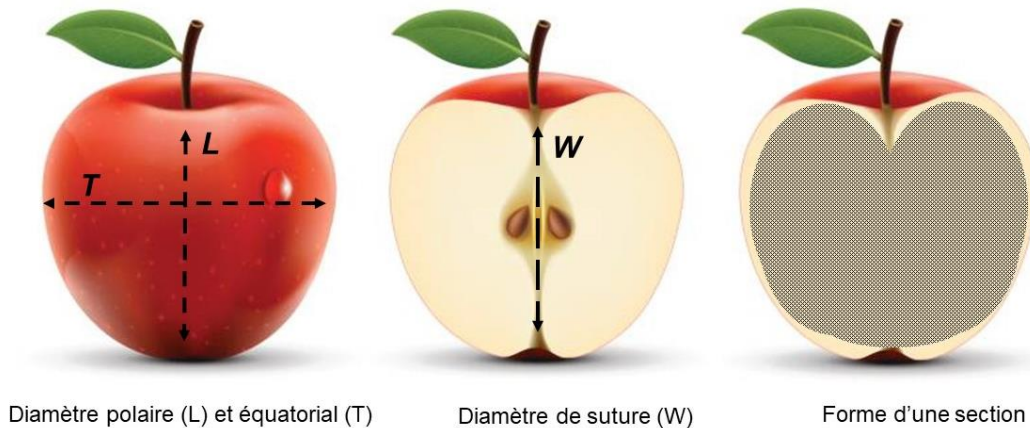
$$E = \frac{T}{L} \quad \text{Equation (2.1)}$$

- La taille ou diamètre arithmétique  $Da$  (mm) (Mohsenin, 1980)

$$Da(mm) = \frac{T+L+W}{3} \quad \text{Equation (2.2)}$$

- Le diamètre moyen géométrique  $Dg$  (mm) (Mohsenin, 1980)

$$Dg (mm) = \sqrt[3]{L.W.T} \quad \text{Equation (2.3)}$$



**Figure 2.2. Représentation schématique de la mesure de la taille et de la forme des pommes.**

- Le diamètre équivalent  $De$  (mm) (Mohsenin, 1980)

$$De (mm) = \left( \frac{L(W+T)^2}{4} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Equation (2.4)}$$

- La surface  $S$  (mm<sup>2</sup>)

$$S (mm^2) = \pi T \cdot \left( L + \frac{T}{2} \right) \quad \text{Equation (2.5)}$$

- Le volume du fruit  $V$  (mm<sup>3</sup>) (Jain et Bal, 1997)

$$V = \frac{\pi.L.W.T}{6} \quad \text{Equation (2.6)}$$

### 2.2.1.4. Analyses mécaniques

#### 2.2.1.4.1. Test de relaxation

Des tests de relaxation ont été conduits afin de quantifier et qualifier les phénomènes visqueux et la résistance des produits. Les tests ont été réalisés avec un analyseur de texture (TA-XT plus, texture (Rhéo, Champlan, France)) constitué d'un capteur de force, d'un piston presseur, et d'un ordinateur permettant l'acquisition et l'enregistrement de mesures (**Figure 2.3**). Les échantillons ont été préparés sous la forme de rondelles de diamètre 1,7 cm et de 1 cm d'épaisseur. Une force de 10 N et une vitesse de déplacement de 1 mm/s avec une déformation maximale de 10% ont été appliqués. La force nécessaire pour maintenir cette déformation constante dans le temps a été donnée.

#### 2.2.1.4.2. Test de coupure

L'objectif de cet essai est d'évaluer la force requise pour couper ou trancher un produit spécifique. Le dispositif utilisé est constitué du même texturomètre que celui décrit ci-dessus (TA-XT plus, (Rhéo, Champlan, France)), équipé d'une lame tranchante (**Figure 2.3**). Lors de cet essai, une vitesse de déplacement de 1 mm/s est imposée. La force nécessaire pour couper le produit à 50% de son épaisseur initiale a été donnée.

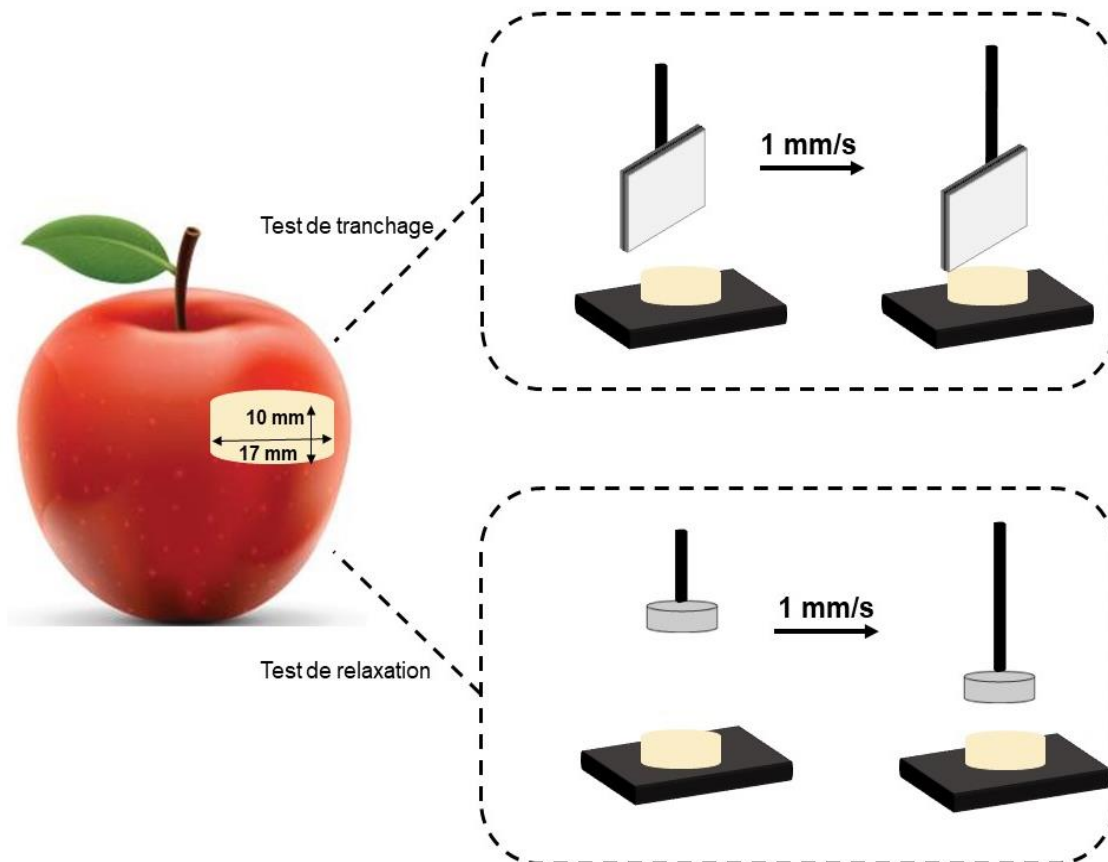


Figure 2.3. Illustration de la procédure des tests de coupure et de relaxation.

## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.2.2. Détermination des propriétés biochimiques

Les propriétés biochimiques des pommes ont été testées sur les jus extraits.

#### 2.2.2.1. Acidité titrable

L'acidité titrable représente la teneur totale en acide du jus de pomme et elle est exprimée en équivalent d'acide malique. L'acidité titrable est calculée après le dosage du jus dilué avec une solution de NaOH (0,1 N).

#### 2.2.2.2. Mesure du pH

Le pH du jus a été déterminé avec un pH-mètre Mettler Toledo (MP 220) après un étalonnage préalable avec des solutions étalons de pH 4 et de pH 7.

#### 2.2.2.3. Détermination du °Brix

La teneur en composés solubles a été suivie en mesurant °Brix le à l'aide d'un réfractomètre numérique (Anggur DR401, France).

#### 2.2.2.4. Analyse de la teneur en polyphénols

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu a été utilisée. Tout d'abord, 1 mL d'une solution du réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois était ajouté à 0,2 mL du jus. Plus tard, 0,8 mL de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (75 g/L) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 60 °C pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, la mesure d'absorbance a été effectuée à 750 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, USA). Une courbe d'étalonnage a été établie à l'aide de solutions d'acide gallique (concentrations comprises entre 0,2 et 1 mg/mL). La teneur en polyphénols a été exprimée en mg d'équivalent acide gallique pour 100 g de matière sèche.

#### 2.2.2.5. Détermination du DPPH, activité de piégeage des radicaux libres

Le radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) a été utilisé pour déterminer l'activité de piégeage des radicaux libres de la variété de chaque échantillon de jus de pomme. Des échantillons de jus de 50  $\mu\text{L}$  ont été mélangés à 1450  $\mu\text{L}$  de radicaux libres DPPH 0,06 mM préparés dans une solution méthanolique. Après 30 min d'incubation à la température ambiante, la réduction du radical libre de DPPH a été mesurée par lecture de l'absorbance à 517 nm. L'activité de piégeage des radicaux libres du DPPH a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Libra S32, Biochrom, France). Le Trolox (en tant qu'antioxydant synthétique) a été utilisé comme contrôle positif et le pourcentage d'inhibition a été calculé conformément à l'équation (2.7).

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Absorbance du control} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance du control}}$$

**Equation (2.7)**



## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.2.2.6. Quantification des sucres

#### 2.2.2.6.1. Méthode de séparation par CLHP

Les concentrations de substrats carbonés ont été déterminées à l'aide d'un instrument de chromatographie en phase liquide à haute performance LC-20AD (Shimadzu, Japon). La séparation a été réalisée en mode isocratique (mélange de 1:4 (20:80) (v:v) eau/acétonitrile avec un débit de 3 ml/min) et en utilisant une colonne Luna 5  $\mu\text{m}$   $\text{NH}_2$  250 x 4,6 mm. La température de séparation a été réglée à 40 °C et les molécules ont été détectées en utilisant un détecteur à diffusion de lumière par évaporation à basse température ELSD-LT II (Shimadzu, Japon). Les échantillons prélevés au cours des processus de fermentation ont été dilués 10 fois dans de l'eau ultra pure et un volume de 1  $\mu\text{L}$  a été injecté. L'assignation et la quantification des composés ont été effectuées à l'aide de courbes standard pré-établies de glucose (5-30 g/L), de fructose (2,5-30 g/L), et de saccharose (2-10 g/L).

#### 2.2.2.6.2. Méthode de dosage par kit enzymatique

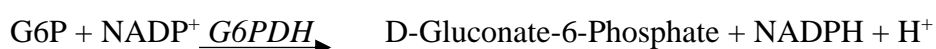
Les concentrations en glucose et fructose peuvent être aussi déterminées par voie enzymatique. Le D-glucose et le D-fructose, en présence d'hexokinase (HK) et d'Adénosine-5-Triphosphate (ATP) sont phosphorylés respectivement en glucose-6-phosphate (G6P) et en fructose-6-phosphate (F6P) :



La phosphoglucose-isomérase (PGI) transforme le F6P en G6P :



Le G6P, en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), est oxydé par le Nicotamide-Adénosine-Dinucléotide ( $\text{NADP}^+$ ) :



La quantité de NADPH formée au cours de la réaction est proportionnelle à celle du D-glucose. Les mesures sont effectuées à 340 nm représentant la longueur d'onde avec le maximum d'absorption du NADPH.

Le kit utilisé (Société LTA (Milan, Italie)) permet la détermination par UV du glucose et du fructose. La procédure était comme suit :

#### Réactifs :

- Buffer: Buffer of Good > 10 mM pH 7,5, NADP > 0,2 mM
- Substrat / Enzyme : ATP > 2 mM HK > 10 U/L
- Starter 1 : G6PDH > 5 U/L
- Starter 2 : PGI > 50 U/L
- Standard Glucose : 25 mg/dL

## 2. Matériels et méthodes

- Standard Fructose : 25 mg/dL

### Procédure :

Réactifs	Blanc ( $\mu\text{L}$ )	Standard glucose ( $\mu\text{L}$ )	Standard fructose ( $\mu\text{L}$ )	Echantillon ( $\mu\text{L}$ )
Substrat enzyme reconstituée	1000	1000	1000	1000
Standard Glucose	--	20	--	--
Standard Fructose	--	--	20	--
Echantillon	--	--	--	20
Eau	20	--	--	--
<b>Agiter et après 3 min mesurer l'absorbance (<math>A_0</math>) par rapport au blanc</b>				
Starter 1	25	25	25	25
<b>Agiter et après 10 min mesurer l'absorbance (<math>A_1</math>) par rapport au blanc</b>				
Starter 2	25	25	25	25
<b>Agiter et après 10 min mesurer l'absorbance (<math>A_2</math>) par rapport au blanc</b>				

### Calculs :

$$\text{Glucose (mg/dL)} = \frac{A_1 (\text{Echantillon}) - A_0 (\text{Echantillon})}{A_1 (\text{Standard glucose}) - A_0 (\text{Standard glucose})} * 25 \quad \text{Equation (2.8)}$$

$$\text{Fructose (mg/dL)} = \frac{A_1 (\text{Echantillon}) - A_0 (\text{Echantillon})}{A_1 (\text{Standard fructose}) - A_0 (\text{Standard fructose})} * 25 \quad \text{Equation (2.9)}$$

Il faut noter que cette méthode est linéaire pour des concentrations inférieures à 100 mg/dL (glucose + fructose).

#### 2.2.2.7. Quantification de l'éthanol

La production d'éthanol au cours de la fermentation du jus de pomme a été déterminée par des mesures de densité à l'aide d'un pycnomètre en verre de 5 mL (Thermo Fisher, France). La courbe d'étalonnage pour la quantification de l'éthanol a été réalisée à l'aide de solutions reconstituées de jus de pomme/éthanol (1-10%, v/v).

#### 2.2.3. Détermination de la concentration en biomasse

##### 2.2.3.1. Comptage cellulaire

La biomasse totale peut être évaluée par comptage au microscope du nombre de microorganismes contenus dans un volume connu. La cellule de Thoma est une lame de

## 2. Matériels et méthodes

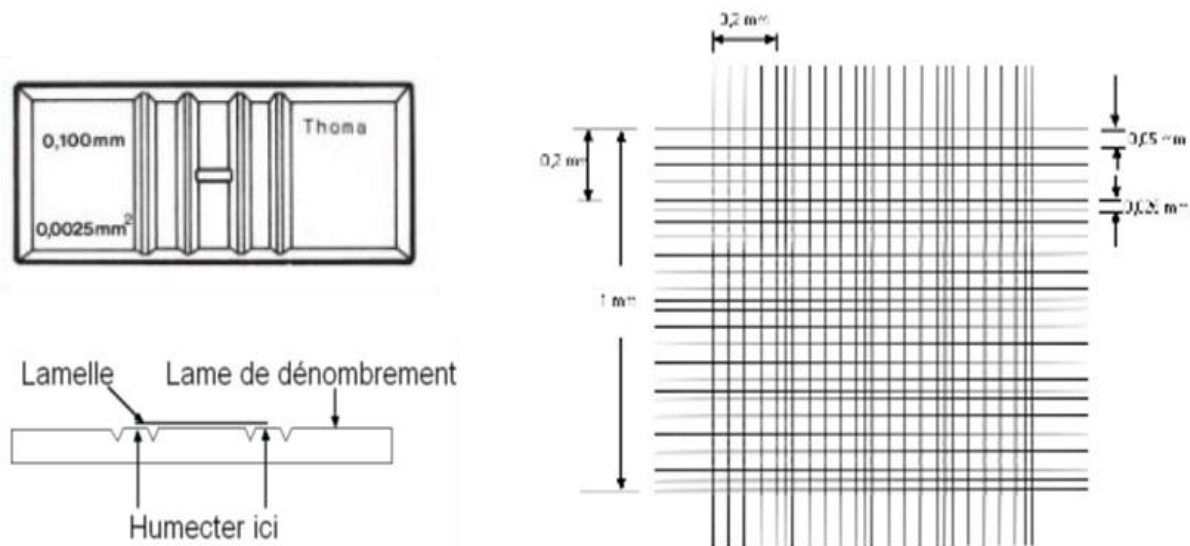
microscope portant une cavité d'une profondeur de 0,1 mm, bordée par deux épaulements (**Figure 2.4**). Le fond de cette cavité comporte un quadrillage de 1 mm<sup>2</sup> formé de 16 grands carreaux, chacun subdivisé en 16 petits carreaux. Cinq grands carreaux sont comptés si la concentration en microorganismes est élevée, alors que le comptage peut couvrir les 16 carreaux si la concentration est faible. Afin d'avoir une erreur inférieure à 10%, le nombre de microorganismes comptés doit être entre 150 et 250 (Lange *et al.*, 1993). Si le nombre de cellules est très élevé, des dilutions ont lieu afin de tomber dans la zone de comptage.

La concentration en cellules par mL de milieu est donnée par la relation :

$$X (\text{cellules/mL}) = \frac{n \cdot 250000 \cdot d}{N} \quad \text{Equation (2.10)}$$

où  $n$  représente le nombre de cellules comptées,  $d$  le facteur de dilution, et  $N$  le nombre de carrés comptés.

Pour estimer la viabilité de la population, l'échantillon est mélangé volume à volume avec du bleu de méthylène. La solution de bleu de méthylène a la composition suivante : 0,1 g de bleu de méthylène dissous dans 1 L de citrate de sodium 2% (poids/volume). Ce réactif colore en bleu les cellules mortes.



**Figure 2.4. Schématisation de la cellule de Thoma**

Un échantillon du milieu (après une éventuelle dilution) est mélangé volume à volume avec la solution de bleu de méthylène. Après homogénéisation, les cellules restent en contact avec le colorant pendant 5 min. Au microscope, les cellules non viables apparaissent en bleu foncé, alors que les cellules viables restent incolores. En effet, deux hypothèses différentes sont proposées pour expliquer le mécanisme d'action du bleu de méthylène. La première explique que le bleu de méthylène se décolore dans le cytoplasme tant que les cellules possèdent une activité enzymatique fonctionnelle. La deuxième hypothèse dit que le bleu de méthylène ne peut traverser la membrane plasmique de la cellule, que lorsque celle-ci devient déficiente (Chilver, Harrison et Webb, 1978; Bonora et Mares, 1982).

## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.2.3.2. Turbidité dans le visible

Cette méthode consiste à mesurer la turbidimétrie du milieu de culture à une longueur d'onde de 600 nm. Les cellules sont en suspension dans un milieu liquide traversé par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée par la suspension est proportionnelle à la concentration des cellules. La relation entre absorbance et concentration en cellules est linéaire dans une gamme de concentration couvrant environ un ordre de grandeur. L'utilisation de cette méthode est limitée aux fermentations en milieu synthétique YPD, où aucun facteur ne pourra influencer la mesure de l'absorbance. Le suivi des fermentations de jus de pommes est fait par comptage de la biomasse sous microscope. A la base, le jus contient de nombreux microorganismes et des débris qui pourront fausser les valeurs de l'absorbance.

### 2.2.4. Isolement et identification d'une souche de levure

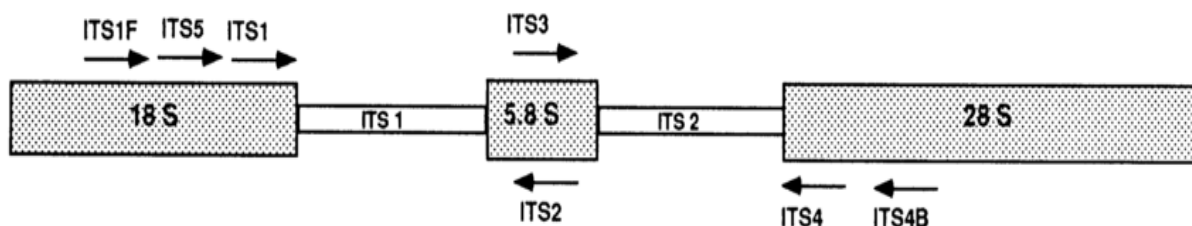
#### 2.2.4.1. Isolement à partir du jus de pommes

L'isolement de la souche indigène a été fait au cours des fermentations spontanées de jus de pommes. Un échantillon de 350 mL de jus a été placé dans un erlenmeyer stérile de 500 mL et incubé à une température de 30 °C et une agitation de 250 rpm. Le jus a été laissé fermenter spontanément pendant 120 h. Des échantillons ont été prélevés à chaque étape de la fermentation. L'évolution de la fermentation a été suivie par la mesure de la densité. Plusieurs dilutions de 10 fois ont été effectuées avec de l'eau peptonée (2%). Des aliquotes ont été réparties sur de la gélose (YPD (Yeast Peptone Dextrose) sélectif) (voir 2.3.1.) afin d'inhiber la croissance des bactéries et des champignons. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 48 h. Les colonies ont été prélevées au hasard et stockées sur une gélose YPD à 4 °C.

#### 2.2.4.2. Identification de la souche

##### 2.2.4.2.1. Caractérisation génétique

L'identification génétique a été basée sur l'analyse des régions transcrites de l'ADN ribosomique. L'ADN ribosomique des eucaryotes est un opéron formé d'une répétition en tandem de plusieurs domaines. Les séquences répétées de cet ADN sont hautement conservées. Les espaceurs internes transcrits (ITS) ont un taux de mutations sensiblement plus élevé sous l'effet d'insertions, de délétions, et de mutations ponctuelles, ce qui permet de mener avec succès des analyses phylogénétiques entre espèces voisines en incluant les ITS (**Figure 2.5**). Ainsi, les séquences hautement préservées et donc communes permettent la création des amorces. La taille et la séquence des ITS sont des révélateurs de polymorphisme. Pour pouvoir détecter ces séquences, une extraction de l'ADN des souches à identifier doit avoir lieu. Les séquences ITS de cet ADN seront amplifiées par la suite par PCR (amplification en chaîne par polymérase). Après migration sur gel, la taille des bandes sera révélée. Pour affirmer le résultat, les régions ITS seront séquencées.



**Figure 2.5.** Schématisation de la structure de l'ADNr fongique et des sites des amorces universelles. Les flèches courtes indiquent les amorces universelles. Les barres montrent les fragments d'ADN amplifiés par PCR en utilisant les amorces universelles (adaptée de Horisawa, *et al.*, (2013))

### 2.2.4.2.2. Les analyses PCR

Les espèces isolées ont été identifiées par PCR en amplifiant la région ITS de l'ADNr. Les séquences d'amorces utilisées sont décrites dans le tableau

**Tableau 2.1.** Description des amorces utilisées.

Nom de l'amorce	Séquence (5' to 3')	Référence
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	(White <i>et al.</i> 1990)

L'amplification a été réalisée dans un volume de 25  $\mu$ L contenant 1  $\mu$ L de chaque amorce, 3  $\mu$ L d'ADN, 0,5  $\mu$ L de dNTP (nucléotides) à 10 mM, 5  $\mu$ L du tampon 5x Phusion HF (Thermo Fisher, France), et 0,25  $\mu$ L d'ADN polymérase de haute-fidélité (Thermo Fisher, France). Les conditions de la PCR étaient les suivantes : dénaturation pendant 3 min à 98 ° C suivie de 35 cycles de dénaturation à 98 ° C pendant 1 min, anelage à 55 ° C pendant 30 s, extension pendant 2 min et extension finale pendant 10 min. Les amplicons ont été chargés sur un gel d'agarose à 1% (100 V - 1 h), puis visualisés sous une lumière UV. L'identification des espèces était basée sur le modèle des bandes pour chaque espèce.

### 2.2.4.2.3. Analyse de la séquence d'ADN

La région ADN-ITS2 ITS1-5.8S a été amplifiée et séquencée à l'aide de l'amorce directe (ITS1) et inverse (ITS4). Le séquençage a été effectué au Sequencing Lab Ebersberg, Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Les séquences ont été analysées à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.3. Conduite des fermentations

#### 2.3.1. Les milieux de fermentation

Les fermentations ont été effectuées soit dans un milieu synthétique YPD soit dans le jus de pomme, dépendamment des études. Le milieu YPD a servi pour la conservation de la levure à 4 °C, et le milieu sélectif a été utilisé lors de l'isolement de la souche. L'optimisation des paramètres de traitement CEP a été effectuée dans le milieu synthétique et par suite les effets des CEP étaient évalués dans le jus de pommes.

##### 2.3.1.1. Les milieux de culture synthétiques

La composition des différents milieux synthétiques utilisés est détaillée dans le tableau 2.2.

**Tableau 2.2 Composition des milieux de culture synthétiques.**

	YPD Liquide	YPD solide	YPD Sélectif
Agar	-	1.5%	1.5%
Glucose	2%	2%	2%
Peptone	1%	1%	1%
Extrait de levure	2%	2%	2%
Chloramphénicol	-	-	0,03%
Cycloheximide	-	-	0,02%

##### 2.3.1.2. Le jus de pommes

Le jus de pommes a été utilisé lors de l'étude des fermentations visant à la production du cidre. Les pommes ont été lavées, coupées, puis pressées avec une centrifugeuse à jus (Moulinex, France).

#### 2.3.2. Culture de *Hanseniaspora* sp.

La pré-culture a été réalisée en prélevant une colonie de la gélose YPD dans 250 mL de YPD liquide dans des conditions stériles. L'incubation a été effectuée pendant 24 h à une température de 30 °C et à une vitesse d'agitation de 250 rpm dans un agitateur (Thermo Scientific, France). Un volume de 1,5 L de jus de pomme introduit dans un fermenteur de 2 L a été inoculé par la pré-culture pour obtenir une concentration initiale de  $3,0 \cdot 10^6$  cellules/mL.

### 2.4. Calcul des paramètres cinétiques.

- La **vitesse de croissance spécifique** de la biomasse :

$$\mu (h^{-1}) = X \cdot \frac{dX}{dt}$$

**Equation (2.11)**

## 2. Matériels et méthodes

---

- Les rendements en biomasse et en éthanol en fonction du substrat :

$$Y_{X/S} (g_{biomasse}/g_{substrat}) = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equation (2.12)}$$

$$Y_{P/S} (g_{produit}/g_{substrat}) = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equation (2.13)}$$

- Le taux de consommation de glucose :

$$\frac{dS}{dt} (g_{glucose}/h) = \frac{S_0 - S_f}{t_f - t_0} \quad \text{Equation (2.14)}$$

- La vitesse spécifique de production d'éthanol :

$$\gamma_{P/S} (g_{ethanol}/g_{biomasse} \cdot h) = \frac{P_f - P_0}{X_f \cdot (t_f - t_0)} \quad \text{Equation (2.15)}$$

où  $X_0$  et  $X_f$  représentent respectivement les concentrations de biomasse initiales et finales,  $P_0$  et  $P_f$  représentent respectivement les concentrations initiales et finales du produit (ex. éthanol),  $S_0$  et  $S_f$  représentent respectivement les concentrations initiales et finales du substrat,  $t_0$  et  $t_f$  représentent respectivement le temps initial et final, et  $X$  représente la concentration de microorganismes au temps  $t$ .

### 2.5. Les traitements physiques

#### 2.5.1. Les champs électriques pulsés

##### 2.5.1.1. Générateur de CEP

Durant la thèse, un seul générateur de faible intensité (400 V, 38 A) a été utilisé pour les différents traitements (**Figure 2.6**). Il se caractérise par la génération d'impulsions bipolaires et il est limité par une tension maximale de 400 V et un courant maximal de 38 A. Le développement et la conception de ce générateur ont été réalisés par le Service Electronique de l'UTC, France.



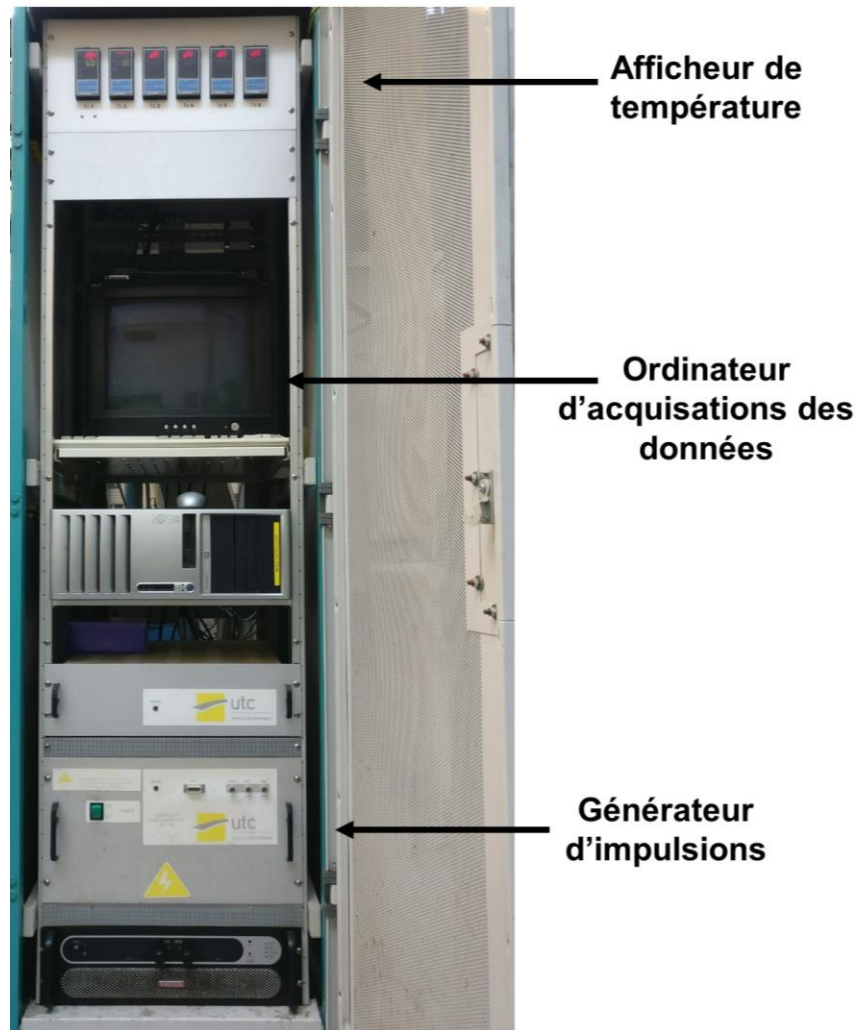


Figure 2.6. Générateur de CEP (400V - 38A)

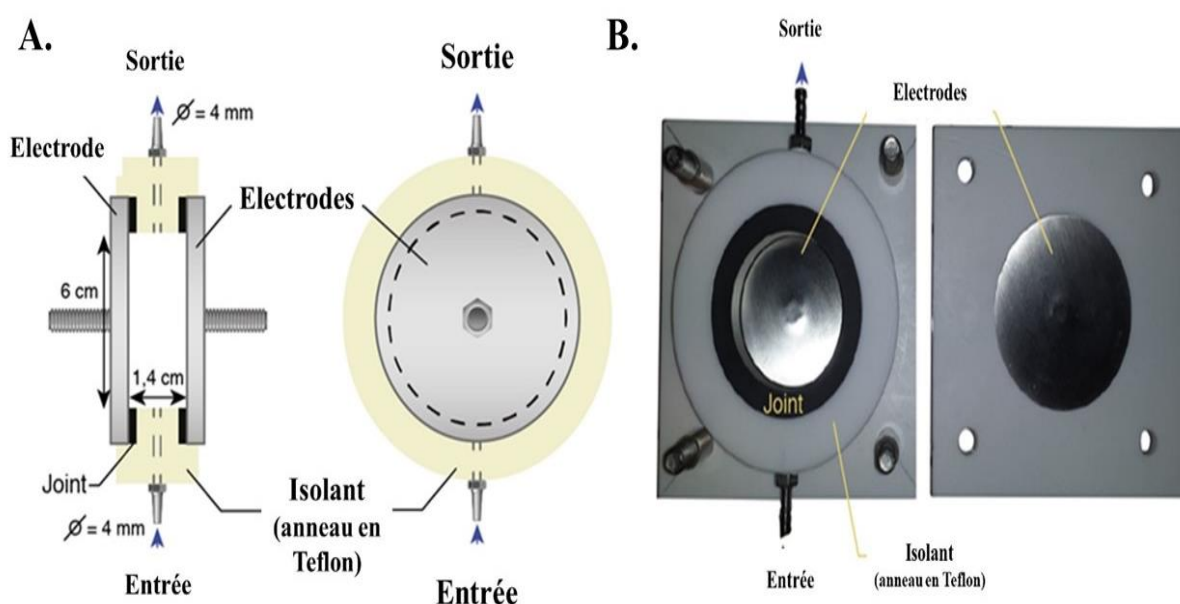
Le générateur est relié à un ordinateur et à un système de protection spécifique qui permet d'arrêter le déclenchement des impulsions électriques une fois le courant maximal est atteint. Un logiciel développé par HPVEE 4.0 Agilent, (Hewlett-Packard, Palo Alto, Californie, Etats-Unis) permet la programmation des signaux électriques et la génération des impulsions de tension, ainsi que la mesure de la résistance de l'échantillon traité. Les caractéristiques du générateur sont détaillées dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3. Caractéristiques du générateur 400 V- 38 A

<b>Tension (U)</b>	0-400 V
<b>Intensité (I)</b>	0 – 38 A
<b>Nombre d'impulsions par train</b>	1 - 10000
<b>Durée de chaque impulsion</b>	10 – 10000 $\mu$ s
<b>Période</b>	1 – 100 ms
<b>Nombre de trains</b>	1 - 1000
<b>Temps de repos entre chaque train</b>	1 – 3600 s
<b>Resistance inter-électrode</b>	0 – 9990 $\Omega$
<b>Fréquence de mesure de la résistance</b>	50 Hz

### 2.5.1.2. La chambre de traitement

Le but de nos travaux était d'évaluer l'effet continu des CEP sur la fermentation des levures. Ainsi, une chambre de traitement a été spécifiquement conçue pour permettre la circulation du milieu et le traitement de la levure par CEP au cours de la fermentation (**Figure 2.7**). À cette fin, deux électrodes parallèles en acier inoxydable (3 mm de large, 6 cm de diamètre) ont été utilisées et fixées entre deux isolants. Un anneau en téflon en forme de disque a été placé entre les électrodes, formant un canal pour le flux de liquide, et fournissant une distance entre les électrodes de 1,4 cm. Le volume de la chambre de traitement était donc d'environ 40 cm<sup>3</sup>. Deux raccords de tuyauterie ont été ajoutés pour le faire fonctionner comme une chambre en continu. Une pompe péristaltique permettait la circulation du milieu du réacteur à la chambre de traitement et son retour dans le réacteur. La longueur totale des tubes utilisés était de 90 cm. La chambre de traitement et les tubes sont stérilisables.



**Figure 2.7. A. Schéma de la chambre de traitement par CEP conçue, B. Photo réelle de la chambre de traitement par CEP.**

### 2.5.1.3. Choix du débit et fermentations contrôlées

Un volume de 1,5 L de milieu YPD a été introduit dans un fermenteur de 2 L (LSL Biolafitte S.A.). Le milieu a été inoculé par une pré-culture pour obtenir une concentration initiale de  $4,5 \cdot 10^6$  cellules/mL. La fermentation en mode batch sans circulation de milieu a été réalisée à une vitesse d'agitation de 250 rpm et la température a été maintenue à 30 °C. Les cinétiques de croissance et de consommation de glucose en mode batch (discontinu) sans circulation de milieu ont été enregistrées. Différents débits de circulation ont été testés (25, 50 et 75 mL/min) sans application de CEP, afin d'obtenir la même cinétique de croissance et de consommation de glucose obtenue en mode discontinu sans circulation (**Figure 2.8**).

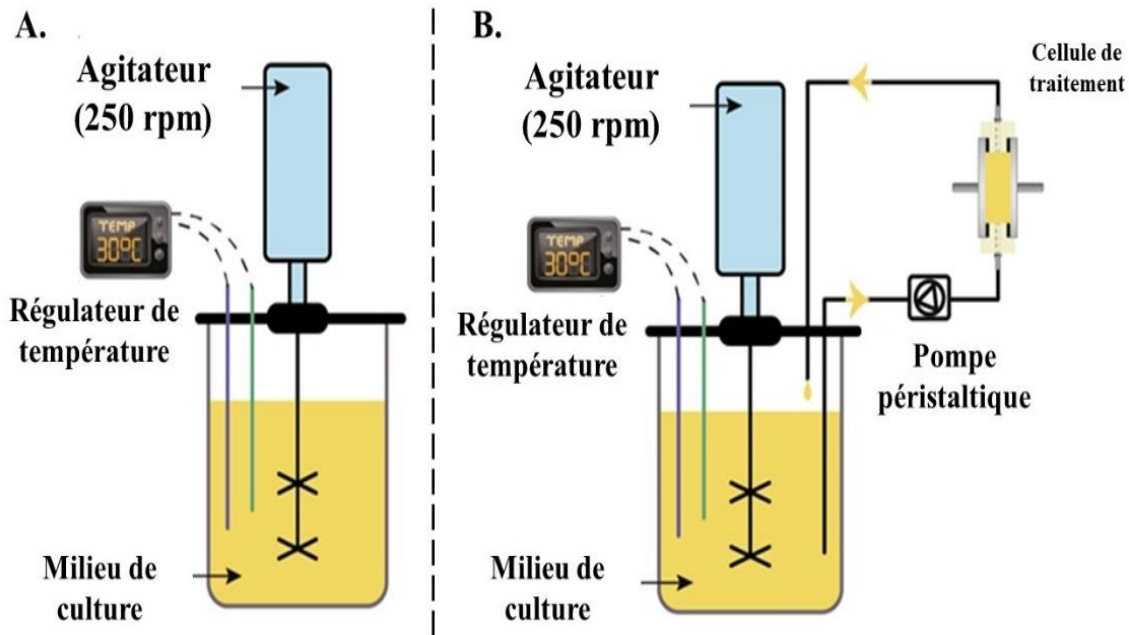


Figure 2.8. A. Fermentation contrôle en mode batch, sans circulation du milieu, B. Fermentation contrôle en mode batch, avec circulation du milieu (sans traitement CEP).

#### 2.5.1.4. Fermentations assistées par CEP

La chambre de traitement conçue a été utilisée pour l'électrostimulation de la levure *Hanseniaspora* sp. isolée à partir du jus de pomme spontanément fermenté. Les effets des CEP sur les levures au niveau de la pré-culture et lors de la fermentation ont été étudiés (Figure 2.9).

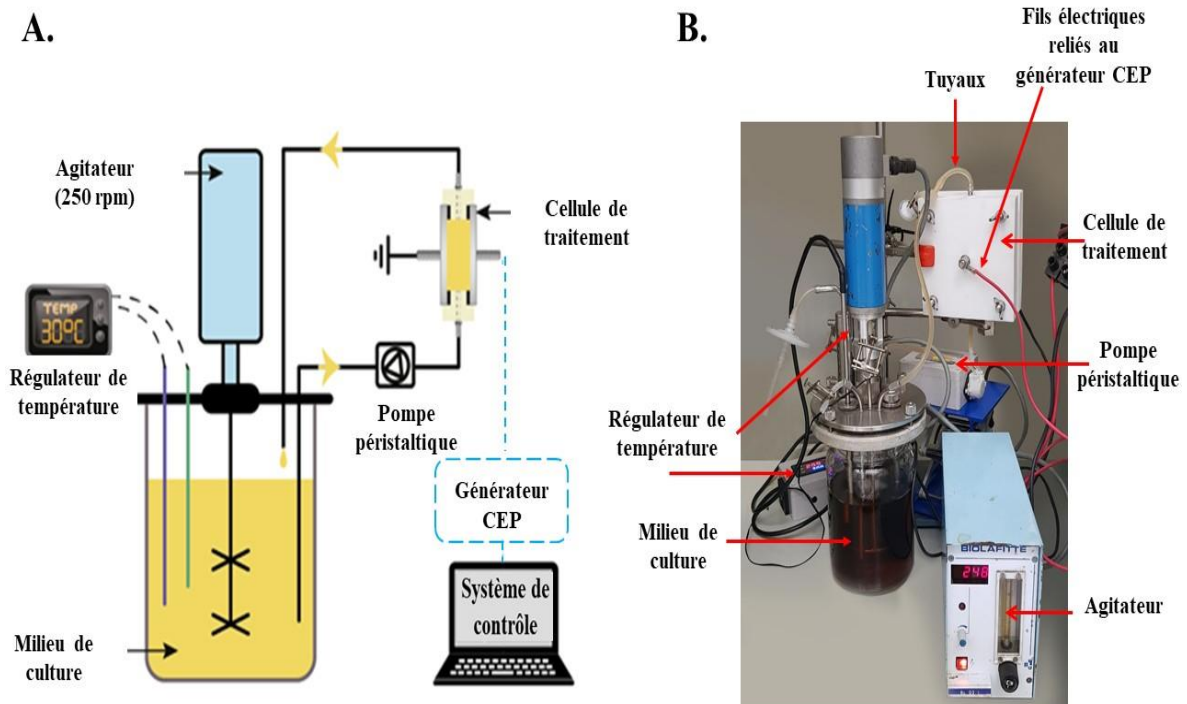


Figure 2.9. A. Schématisation des fermentations assistées par CEP, B. Détails du montage de traitement de la pré-culture par CEP (le générateur CEP non présenté).

## 2. Matériels et méthodes

---

Les traitements par CEP ont consisté à appliquer une succession de trains composés chacun de  $n = 10$  impulsions au cours des phases de fermentation de latence et exponentielle. Chaque durée d'impulsion a été fixée à  $t_i = 100 \mu\text{s}$ , avec une durée de période d'impulsion de  $\Delta t = 1 \text{ ms}$ . Le temps entre les trains était fixé à  $\Delta t = 1 \text{ s}$ . Lors du traitement du milieu de culture pendant les phases Lag et Log correspondant toutes les deux à 6 h, le nombre de trains  $N$  appliqués était de 10 716, ce qui correspondait à un traitement électrique effectif  $t_{CEP}$  de 10,716 s.

### 2.5.1.5. Calcul des paramètres de traitements par CEP

#### 2.5.1.5.1. Temps efficace de traitement

C'est le temps de traitement réel sans prendre en compte les repos entre les différences impulsions et trains. Il peut être calculé selon l'équation 2.16 :

$$t_{CEP}(s) = N \cdot n \cdot t_i (s) \quad \text{Equation (2.16)}$$

où  $N$  correspond au nombre de train total,  $n$  correspond au nombre d'impulsions par train, et  $t_i$  correspond à la durée de chaque impulsion (s).

#### 2.5.1.5.2. La consommation électrique spécifique

La consommation électrique spécifique du traitement par CEP  $W$  (J/mL) a été calculée selon l'équation (2.17).

$$W \text{ (J/mL)} = \sum_{i=1}^{N \cdot n} (U \cdot I \cdot t_i) / V \quad \text{Equation (2.17)}$$

où  $U$  correspond à la tension (V),  $I$  correspond à l'intensité du courant (A) et  $V$  correspond au volume du milieu de culture dans le bioréacteur (mL).

## 2.5.2. Les ultrasons

### 2.5.2.1. Le générateur utilisé

Le générateur d'US a été conçu et développé pour fournir une puissance maximale de 100 W. L'appareil expérimental (**Figure 2.10**) est composé d'un générateur d'US relié à un minuteur qui régule la génération des US selon des cycles de traitements et de repos. Les US seront générés au niveau d'une cellule de traitement.

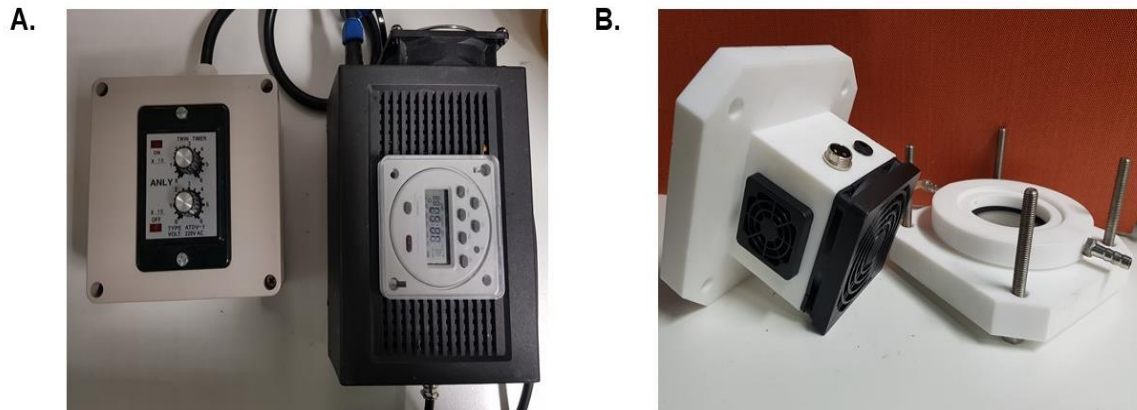


Figure 2.10. Appareil expérimental d'US : A. Générateur et minuteur, B. Cellule de traitement.

### 2.5.2.2. La cellule de traitement

On rappelle que le but de l'étude est d'évaluer l'impact des traitements physiques des US appliqués en continu sur la fermentation des levures. Une cellule de traitement ayant les mêmes dimensions que celle du traitement par CEP a été ainsi conçue. Deux plaques parallèles en acier inoxydable (3 mm de large et 6 cm de diamètre) ont été fixées entre deux anneaux en téflon, créant ainsi un canal pour le liquide en écoulement. Le volume de la chambre de traitement était d'environ 40 ml (ce qui représente un rapport de 1:50 entre le volume du fermenteur et le volume de la chambre). Deux raccords de tuyauterie ont été joints pour le faire fonctionner comme une chambre continue. Un transducteur (100 W, 40 kHz) fixé à la chambre et connecté à l'alimentation (220 V) convertissait la ligne de tension électrique disponible en ondes haute fréquence (**Figure 2.11**). Une pompe péristaltique permettait la circulation du fluide du réacteur à la chambre de traitement et son retour dans le réacteur. La longueur totale des tubes utilisés était de 90 cm. La chambre de traitement et les tubes sont stérilisables. La même méthodologie de choix du débit que celle du traitement par CEP a été suivie.

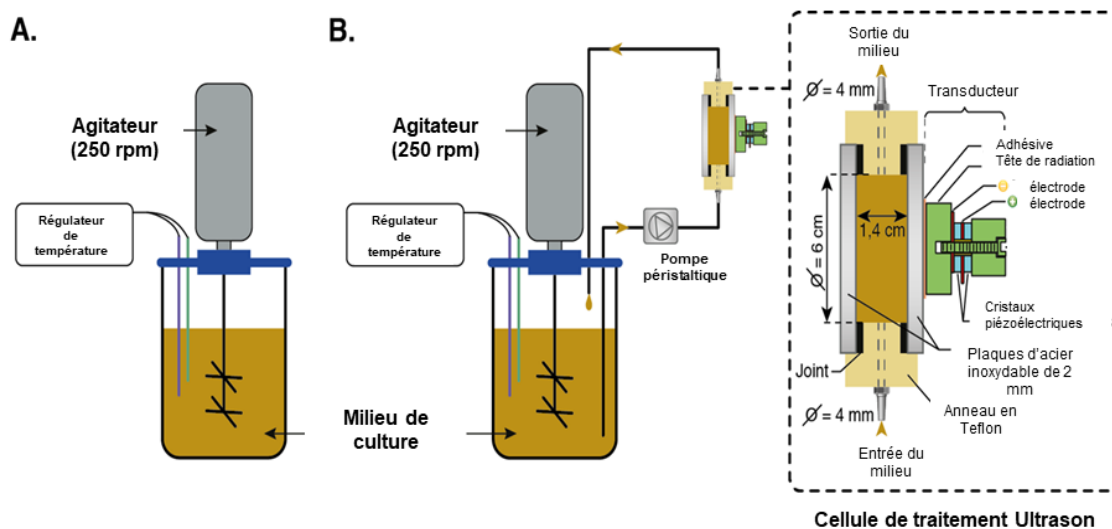


Figure 2.11. A. Fermentation contrôlée en mode batch, B. Fermentation assistée par US et détails de la cellule de traitement par US.

## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.5.2.3. Fermentations assistées par US

Les effets des ultrasons sur les levures au niveau de la pré-culture et lors de la fermentation ont été étudiés.

L'optimisation des paramètres a été étudiée lors de la croissance de la levure dans un milieu synthétique YPD. Différentes fréquences d'impulsions ont été testées. Le traitement a été effectué en premier lieu au cours des 6 premières heures de la fermentation (pendant les phases de latence et exponentielle). Le temps de repos était fixé à 6 s et le temps des impulsions variait entre 0,5 s, 1 s, et 2 s. Plus tard, le traitement a été effectué par phases pour la fréquence d'impulsion optimale trouvée. Le traitement a ensuite été effectué soit dans les 3 premières heures de la fermentation (phase de latence), soit pendant 3 heures de la phase exponentielle.

Les fermentations dans le jus de pommes ont été assistées par US :

- 1) lors des 6 premières heures de la pré-culture,
- 2) durant les 12 premières heures de fermentations.

### 2.5.2.4. Calcul des paramètres de traitements par US

#### 2.5.2.4.1. Temps effectif de traitement

C'est le temps de traitement réel ( $t_{us}$ ) sans prendre en compte les temps de repos. Il peut être calculé selon l'équation 2.18 :

$$t_{us} = a\Delta t_p \quad \text{Equation (2.18)}$$

où  $a$  correspond au nombre d'impulsions,  $\Delta t_p$  à la durée d'impulsion des US (s).

#### 2.5.2.4.2. La consommation électrique spécifique

Le générateur d'US enregistre l'énergie  $E$  consommée durant le traitement en Wh. Ainsi, la consommation d'énergie spécifique du traitement par US  $W$  (J/mL) a été estimée à l'aide de l'équation (2.19).

$$W \text{ (J/mL)} = E * 3600/V \quad \text{Equation (2.19)}$$

où  $E$  correspond à l'énergie (Wh) fournie par le générateur et  $V$  au volume du milieu de culture dans le bioréacteur (mL).

## 2.6. Les analyses statistiques

Chaque expérience a été répétée trois fois. Une analyse ANOVA unidirectionnelle a été utilisée pour l'analyse statistique des données à l'aide du logiciel Statgraphics Plus (version 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginie, États-Unis). Un niveau de signification de 5% a été choisi pour chaque analyse. Les barres d'erreur présentées dans les figures correspondent aux écarts types.

---

## 3. Résultats et discussions

---

Ce chapitre présentera les résultats et discussions des études réalisées au cours de ce travail de thèse.

Dans un premier temps, l'étude portant sur le potentiel fermentaire des pommes libanaises sera présentée. Une souche indigène de levure présente lors de la fermentation spontanée des pommes libanaises « Ace spur » a été isolée et identifiée. Par la suite, son potentiel fermentaire a été évalué dans le jus de pommes libanais « Ace spur » et dans un jus de pommes à cidre de la variété française « Kermerrien » utilisée industriellement pour la production du cidre.

Dans un second temps, l'impact des technologies émergentes de CEP et d'US sur l'activité fermentaire de la levure isolée sera étudié. Le but de ces travaux porte sur l'évaluation de l'effet en continu de ces technologies sur la fermentation.

### 3.1. Etude du potentiel fermentaire des pommes libanaises de la variété « Ace spur ».

L'étude vise à la valorisation de la pomme libanaise en transformant son jus en cidre. En effet, le cidre est un produit non élaboré industriellement au Liban. On s'est intéressé alors à la production d'un produit authentique avec des qualités organoleptiques différentes en utilisant un ferment indigène. L'évaluation de la capacité des pommes libanaises à la production du cidre est une étape indispensable dans notre projet. La qualité et les caractéristiques du produit fermenté pourrait être affecté par la qualité de la matière première mais aussi par le ferment utilisé. Une première étude a porté sur l'évaluation de la capacité d'un ferment isolé lors de la fermentation spontanée des pommes libanaises. Une variété de pomme à cidre française « Kermerrien » utilisée industriellement a été choisie comme témoin pour nos études. Une deuxième étude a porté sur l'évaluation de la composition physico-chimique des pommes libanaise « Ace spur » à la production du cidre. En fait, une composition physico-chimique spécifique des pommes est requise pour la production d'un cidre de qualité. De même, des propriétés physiques telles la forme et la résistance à la coupe sont indispensables pour que la pomme soit manipulée industriellement. Ces études permettront alors d'avoir une idée sur le potentiel fermentaire des pommes libanaises.

#### 3.1.1. Evaluation de la capacité d'élaboration de cidre de la souche indigène *Hanseniaspora sp.*

##### 3.1.1.1. Résumé de l'article

Ces travaux avaient pour but d'étudier le potentiel du jus de pomme libanais pour la production de cidre. Ceci pourrait présenter une alternative pour la valorisation de l'excédent de pommes retrouvées sur le marché. Durant cette étude, nous avons sélectionné une souche de levure indigène des pommes libanaises « Ace spur », sa capacité de fermentation sur cette pomme et les pommes à cidre « Kermerrien » a été évaluée. Le séquençage a permis d'identifier cette espèce comme faisant partie du genre *Hanseniaspora*. Les jus de pommes inoculés ont révélé la capacité



### 3. Résultats et discussions

---

de fermentation de cette souche, qui a pu fermenter jusqu'à 4 % et 3,5 % d'éthanol (v,v) les jus de pommes « Ace spur » et « Kermerrien », respectivement. En outre, la levure a été caractérisée par sa capacité à métaboliser des concentrations élevées de sucre (200 g/L) et par un rendement de production d'éthanol similaire à celui trouvé dans la littérature. Cette levure a des cinétiques de croissance et de production d'éthanol plus rapide lors de la fermentation du jus de pomme « Ace spur » que dans le jus français « Kermerrien ». Nos résultats mettent ainsi en évidence la possibilité d'utiliser cette souche indigène de *Hanseniaspora* comme seul agent fermentatif lors de la production du cidre.

#### **3.1.1.2. Article: Evaluation of the fermentative capacity for cider production by an indigenous *Hanseniaspora* sp. strain isolated from Lebanese apples.**

*(Voir le manuscrit qui suit)*

#### **Evaluation of the fermentative capacity of an indigenous *Hanseniaspora* sp. strain isolated from Lebanese apples for cider production**

Marina AL DACCACHE <sup>1,4</sup>, Dominique SALAMEH <sup>1</sup>, Laure EL CHAMY <sup>2</sup>, Mohamed KOUBAA <sup>3</sup>, Richard G. MAROUN <sup>1</sup>, Eugène VOROBIEV <sup>4</sup>, Nicolas LOUKA <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculté des Sciences, Centre d'Analyses et de Recherche, UR TVA (Technologies de Valorisation Agroalimentaires, Laboratoire CTA, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon.

<sup>2</sup> Faculté des Sciences, Centre d'Analyses et de Recherche, UR GPF, Laboratoire BGF, Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon.

<sup>3</sup> ESCOM, UTC, EA 4297 TIMR, 1 allée du réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France.

<sup>4</sup> Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA 4297 TIMR, Centre de recherche Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne cedex, France.

Soumis dans le journal *FEMS Microbiology Letter*

#### Abstract

At present, several studies showed that apples stand as one of the most wasted fruits compared to other fruits and vegetables. The present work studied the potential of Lebanese apples for cider production, which could be a valuable method to control apple wasting. An indigenous yeast strain was first isolated from a spontaneous fermented juice of the Lebanese apple variety “Ace spur”. The sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) domain of ribosomal DNA identified the isolated yeast strain as a member of the *Hanseniaspora* genus. The isolated strain was then used to evaluate its fermentative capacity on both Lebanese “Ace spur” apples and the industrial “Kermerrien” cider apples. The results revealed that the isolated strain was able to ferment up to 4%, and 3.5% of ethanol (v/v) in the “Ace spur” and “Kermerrien” apple juices, respectively. Our findings emphasize the use of Lebanese “Ace spur” apples for cider production and highlight the possibility of using the isolated indigenous *Hanseniaspora* strain as a sole fermentative agent during cider production.

**Keywords :** Indigenous strains, *Hanseniaspora* sp., fermentation, apple juice, cider.

#### Introduction

Apple cultivation is continuously increasing in Lebanon, accounting for up to 23% of the national agricultural production. Nevertheless, apple producers are struggling to sell their production due to the different conflicts in the region. The industrial transformation of apples for cider production, for instance, would help alleviate this crisis.

Spontaneous cider fermentation is considered as a common method for cider production to preserve the authenticity and the characteristics of the apples used (Cousin *et al.* 2017). At present, the selection of new strains suitable for cider production has gained an increased attention (Lorenzini *et al.* 2019). Native yeasts are more and more used since they add some characteristics to the product giving it a unique character or “personality” (Morrissey *et al.* 2004; Moreira *et al.* 2008; Francesca Comitini *et al.* 2011). Moreover, the use of isolated local yeasts presents the advantage of being more accommodated to the environmental conditions, making them more competitive and effective (Rai, Pandey and Sahoo 2019). Thus, the selected yeasts are the most adapted to produce cider, retaining the characteristics of apples, and capable to enhance the organoleptic properties (Tristezza *et al.* 2014) and avoid sensory deviation (Cousin *et al.* 2017) of the final product in comparison with spontaneous alcoholic fermentation. For example, *Hanseniaspora* sp. yeast strains add fruity sensory aromas, and hybrid strains of *Saccharomyces eubayanus* and *S. cerevisiae* improve the performance of fermentation (Cousin *et al.* 2017).

The most common yeasts used for cider production belong to the genus *Saccharomyces*, especially *S. bayanus* followed by *S. cerevisiae* (Andrew and Piggott 2003; Valles *et al.* 2007; Lorenzini *et al.* 2019). Nonetheless, during the different juice fermentation stages a wide range of non-*Saccharomyces* species have been identified, including *Candida pelliculosa*, *C. vini*, *H. uvarum*, *H. valbyensis*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia ohmeri* (Cabranes, Moreno and Mangas 1990; Valles *et al.* 2007). These non-*Saccharomyces* yeasts are mainly present during the first stages of

### 3. Résultats et discussions

---

fermentation and have a low fermentative capacity (Romano *et al.* 1997), while ethanol-tolerant *S. cerevisiae* species are mainly detected in the middle and final stages (Terpou *et al.* 2019). Renewed interest is being shown for their potential to produce low alcohol and more complex products due to their ability to enhance certain aromas (Contreras *et al.* 2015; Gamero *et al.* 2016; Morales *et al.* 2019). In parallel, some yeast strains may add unpleasant flavors to the final product. Buron *et al.* (2012) found that the yeasts *Dekkera anomala* and *Lactobacillus collinoides* added phenolic off-flavors to cider. Yeast metabolism may vary according to different parameters such as the culture conditions and the yeast strain (Thierie and Penninckx 2010). For instance, sugar concentration and oxygen availability in the media are among the main influencing factors (Rodrigues, Ludovico and Leão 2006). Alcohol fermentation is not always performed under oxygen-limited conditions (Concetta Compagno, Sofia Dahko 2014; Dashko *et al.* 2014). Some strains have the capacity to produce alcohol under aerobic conditions and excess sugar, they are known as Crabtree positive yeasts (Gaden 1959; Deken 1966; Thierie and Penninckx 2010). In the “Crabtree” effect, certain enzymes involved in the oxidative pathway of the cellular metabolism are catabolite repressed, thus the metabolism is shifted into the synthesis of ethanol via fermentative conversion, even if significant oxygen concentrations are found into the culture medium (Ratledge 1991; Sarris *et al.* 2014).

In the perspective of using Lebanese apples for cider production, this study aimed at evaluating the fermentative potential of “Ace spur” apple variety using indigenous yeast. The fermentative potential of the isolated yeast strain was compared to that obtained upon its usage for the juice fermentation of an industrial “Kermerrien” cider apple variety.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and apples

Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), and peptone were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Chloramphenicol, cycloheximide, and yeast extract were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Fructose and sucrose were purchased from Merck Millipore (Burlington, United States). The apples used in this work; “Ace spur” variety, were collected from the region of Bqaatouta (Keserwan, Lebanon), whereas the “Kermerrien” French cider apples were kindly provided by the IFPC (“Institut Français des Productions Cidricoles”) located in “Le Rheu” city (France).

### 2.2. Spontaneous fermentation

“Ace spur” apples were first washed and then used to extract the juice using a fruit juice centrifuge separator (Moulinex, France). A sample of 350 mL juice was placed in a sterile 500-mL Erlenmeyer flask and incubated at 30 °C and 250 rpm. The juice was left to ferment spontaneously during 120 h.

### 2.3. Yeast sampling and isolation

Samples were taken at each phase of the fermentation. Fermentation’s evolution was followed up by measuring the density of the juice (Bedriñana, Simón and Valles 2010). Several

### 3. Résultats et discussions

---

dilutions of 10 times were performed with peptoned water (2 %). Aliquots were spread on Yeast Extract- Peptone- Dextrose (YPD) agar (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose, and 2 % agar) supplemented with a final concentration of 300 mg.L<sup>-1</sup> chloramphenicol and 100 mg.L<sup>-1</sup> cycloheximide to inhibit the bacterial growth. Petri dishes were incubated at 30 °C during 48 h. Colonies were randomly picked and stored on YPD agar at 4 °C.

#### 2.4. Genetic characterization

##### 2.4.1. DNA extraction, amplification and sequencing

Isolated colonies were picked from the plate and suspended in 50 µL sterile water. The tubes were incubated for 10 min at 100 °C. Cellular fragments were removed by centrifugation and DNA was recovered in the supernatant. The Internal transcribed spacer (ITS) domain comprising the ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 was amplified by PCR using different sets of primers as shown in table 1 PCR reactions were carried in a total volume of 25 µL using the Phusion high fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher, France) following the manufacturer's instructions. Amplification was performed using ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the following conditions: 3 min of initial denaturation at 98 °C followed by 35 cycles of denaturation at 98 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 30 s, extension for 2 min, and a final extension for 10 min. 2 µL of each PCR reaction were loaded on a 1 % (w/v) agarose gel and subjected to electrophoresis at 100 V for approximately 1 h. The amplicons were visualized using ethidium bromide under UV light.

**Table 1.** Description of the sets of primers used in this study. Sequences are all listed 5' to 3' for the oligonucleotides.

Primers	Sequence (5'to 3')	Reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS2	GCTGCGTTCATCGATGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	(White <i>et al.</i> 1990)

DNA fragments were sequenced at the Eurofins Genomics (Eurofins Genomics, Edersberg, Germany) using both forward and reverse primers. Forward and reverse sequences were verified by alignment using Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011). The searches for sequence similarity were performed using the BLAST algorithm to compare the query sequences with the yeast species type strains sequences in the YeastIP database ([genome.jouy.inra.fr/yeastip/index.php](http://genome.jouy.inra.fr/yeastip/index.php)) (Weiss *et al.* 2013).

#### 2.5. Laboratory scale fermentations

The fermentative capacity of the isolated and characterized yeast strain was performed using juices obtained from Lebanese (“Ace spur” variety) and French (“Kermerrien” cider variety) apples. The pre-culture was performed by taking one colony of the isolated strain from YPD agar (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose, and 2 % agar) plate into 250 mL of liquid YPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose) medium under sterile conditions. The incubation was performed for 24 h at 30 °C temperature, and 250 rpm agitation speed in a shaker (Thermo Scientific, France). A volume of 1.5 L apple juice (either of “Ace spur” or “Kermerrien” varieties) was introduced in a 2-L fermenter and was inoculated by a pre-culture to get an initial concentration of  $3.0 \cdot 10^6$  cells. mL<sup>-1</sup>. Fermentation was performed in triplicate at 30 °C and 250 rpm. Growth and substrate consumption kinetics were recorded during fermentation. The content in soluble compounds was followed by measuring the °Brix using a digital refractometer (Anggur DR401, France). Ethanol production during apple juice fermentation was determined by density measurements using a 5-mL glass pycnometer (Thermo Fisher, France). Calibration curve for ethanol quantification was performed using reconstituted solutions of apple juice/ethanol (1-10%, v/v).

##### 2.5.1. Cell counting

Samples were periodically taken during the fermentation process for yeast cell counting. Several dilutions were made, and the cells were counted using a Thoma cell counting chamber (Preciss, France). The biomass concentration  $X$  (cells.mL<sup>-1</sup>) was calculated according to equation (1). The specific growth rate  $\mu$  (h<sup>-1</sup>), the biomass yield  $Y_{X/S}$  (g<sup>(biomass)</sup>.g<sup>-1</sup>(substrate)), the product yield  $Y_{P/S}$  (g<sup>(product)</sup>.g<sup>-1</sup>(substrate)), and the ethanol production rate  $\gamma$  (g<sup>(ethanol)</sup>.g<sup>-1</sup>(biomass).h<sup>-1</sup>) were calculated according to equations (2), (3), (4), and (5), respectively.

$$X \text{ (cells.mL}^{-1}\text{)} = \frac{n \cdot 250000 \cdot d}{N} \quad \text{Equation (1)}$$

where  $n$  represents the number of cells counted,  $d$  represents the dilution factor, and  $N$  represents the number of squares counted in the chamber.

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = X \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{Equation (2)}$$

$$Y_{(X/S)} \text{ (g}_{\text{biomass}} \cdot \text{g}_{\text{substrate}}^{-1}\text{)} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equation (3)}$$

where  $X_0$  and  $X_f$  represent respectively the initial and final biomass concentrations, and  $S_0$  and  $S_f$  represent respectively the initial and the final substrate concentrations.

$$Y_{P/S} \text{ (g}_{\text{product}} \cdot \text{g}_{\text{substrate}}^{-1}\text{)} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equation (4)}$$

$$\gamma \text{ (g}_{\text{ethanol}} \cdot \text{g}_{\text{biomass}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)} = \frac{P_f - P_0}{X \cdot (t_f - t_0)} \quad \text{Equation (5)}$$

### 3. Résultats et discussions

---

where  $P_o$  and  $P_f$  represent respectively the initial and final product concentrations, and  $S_o$  and  $S_f$  represent respectively the initial and final substrate concentrations.

#### 2.5.2. Carbon substrates quantification

The concentrations of carbon substrates were determined using high performance liquid chromatography instrument LC-20AD (Shimadzu, Japan). The separation was performed in isocratic mode (a mixture of 1:4 (20:80) (v:v) water:acetonitrile with a flow rate of 3 mL.min<sup>-1</sup>), and using a Luna 5 µm NH<sub>2</sub> 250 x 4.6 mm column. The separation temperature was set to 40 °C and the molecules were detected using a low temperature evaporative light scattering detector ELSD-LT II (Shimadzu, Japan). The samples taken during the fermentation processes were diluted 10 times in ultra pure water and a volume of 1 µL was injected. The compounds' assignation and quantification were performed using pre-established standard curves of glucose (5-30 g.L<sup>-1</sup>), fructose (2.5-30 g.L<sup>-1</sup>), and sucrose (2-10 g.L<sup>-1</sup>).

#### 2.6. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for the statistical analysis of the data with the help of Statgraphics Plus software (version 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Significance level at 95% confidence was taken for each analysis. The values presented in the figures correspond to the mean value of the repetition, and the error bars correspond to the standard deviations of each measurement.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Yeast isolation and characterization

In order to evaluate the use of Lebanese “Ace spur” apples for cider production by employing an indigenous yeast strain, yeast colonies were isolated during the different fermentation phases of apple juice. In this study, one colony was randomly selected for the characterization of its fermentative capacities. In YPD liquid medium after 48 h at 30 °C, colony cells are ovoid to elongate and apiculate, single or in pairs and budding is bipolar. For species identification, we opted for the amplification and sequencing of the ITS domain that is used as a universal DNA barcode for fungi (Schoch *et al.* 2012; Kurtzman *et al.* 2015). PCR amplification of the full ITS (f-ITS) domain (comprising ITS1, 5.8S rDNA gene, and ITS2) using the ITS1 and ITS4 primers yielded a DNA band of approximately 700 base pairs (bp). Sequencing of the purified PCR product using the ITS1 primer revealed frequent double peaks in the sequencing electropherograms. A better resolution of the sequence was obtained using the ITS4 reverse primer, which showed unambiguous 503 nucleotide reads, followed by frequent double peaks. ITS sequence analysis was repeated on amplified DNA of the ITS1 and ITS2 domains separately using the ITS1/ITS2 and ITS3/ITS4 primer pairs, respectively. Both yielded DNA bands comprised between 300 and 400 bp. The same results were observed with frequent double peaks in the ITS1 sequencing electropherograms and a high-quality sequence of 330 nucleotides obtained for the amplified DNA fragment of the ITS2 domain. In order to exclude any contamination, DNA extraction was repeated on a new isolated colony of the selected yeast strain, and the amplification and sequencing of the ITS domain were performed using the ITS5 primer in combination with

### 3. Résultats et discussions

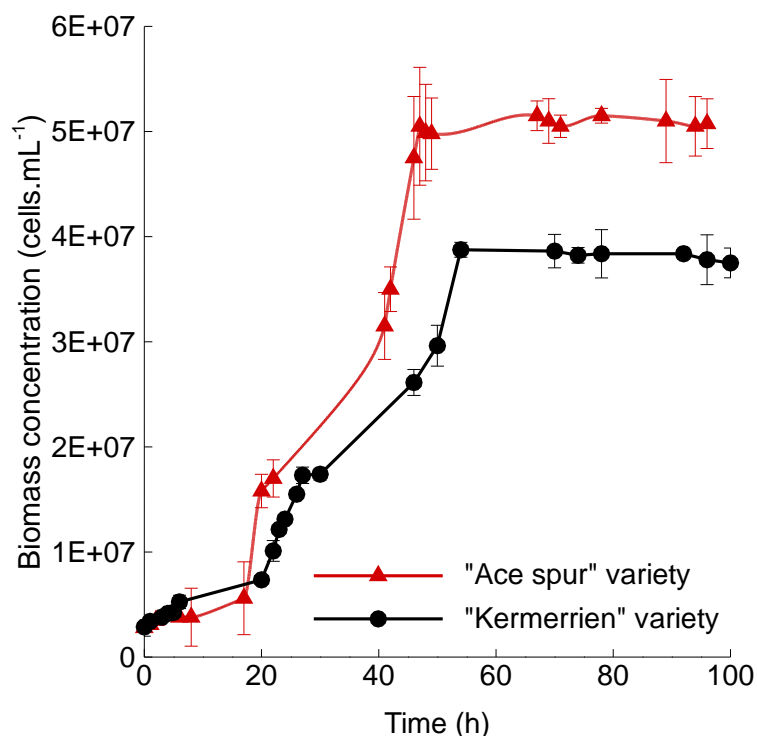
---

ITS2 and ITS4 primers for analyzing the ITS1 and the f-ITS domains, respectively. Sequencing of the ITS2 domain was also repeated using the ITS3/4 primer pairs. Sequence analysis confirmed the previously obtained results: the sequencing of the f-ITS was only interpretable while performed with the ITS4 reverse primer, which retrieved a 503 nucleotide reads followed by double peaks in the sequence traces, whereas sequencing of the ITS2 domain was completely successful. Multiple sequence alignments confirmed the homogeneity of all the obtained sequences and retrieved a partial sequence of 503 nucleotides of the f-ITS rDNA fragment. These results are evocative of an intragenomic ITS sequence heterogeneity in the isolated yeast strain more precisely in its ITS1 domain. The sequence similarity of the retrieved partial f-ITS sequence was evaluated by alignment with ITS sequences of yeast species type strains on the YeastIP database ([genome.jouy.inra.fr/yeastip/index.php](http://genome.jouy.inra.fr/yeastip/index.php)) (Weiss *et al.* 2013). This indicated that the isolated strain belongs to the apiculate *Hanseniaspora* genus. Sequence analysis confirmed that the retrieved query sequence comprised full 5.8S and ITS2 domains and a partial sequence of the ITS1 domain. Blast analysis was repeated using only the ITS2 domain, which showed 99-100% similarity (100% query coverage) to different *Hanseniaspora* species. Since species resolution for ascomycetes requires more than 1% divergence, these results imply that further molecular characterization is required for the species assignment of the isolated strain (Kurtzman and Robnett 1998; Kurtzman *et al.* 2015). However, although intragenomic ITS sequence heterogeneity has already been documented for several fungal species (Simon and Weiss 2008; Alper, Frenette and Labrie 2011; Zhao *et al.* 2015), to our knowledge this is the first report for its occurrence in *Hanseniaspora* species. These results prompted us to further characterize the fermentative capacities of the isolated indigenous yeast strain for cider production while awaiting a further characterization of its taxonomic classification.

#### 3.2. Cider production by fermentation

The fermentative capacity of the isolated *Hanseniaspora* sp. strain was tested using both Lebanese “Ace spur” and French cider “Kermerrien” apple juices. Kinetics of growth (Figure 1), substrate consumption, and ethanol production (Figure 2) were recorded during fermentation. Figure 1 indicates that *Hanseniaspora* sp. is able to grow on both juices with distinguishable latency, exponential and stationary phases. Yeast cells were observed under microscope during the different stages and a homogeneous culture was noticed. The biomass evolution during the time shows that the yeast growth takes place following a typical fermentative kinetic. The concentration of microorganisms reaches a maximum of  $5.2 \cdot 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> in the Lebanese apple juice, compared to  $3.8 \cdot 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> in the “Kermerrien” cider apple juice. In addition, slight differences have been observed for the maximum growth rates with 0.20 h<sup>-1</sup> and 0.16 h<sup>-1</sup> for the respective juices. Furthermore, the stationary phase is reached after 44 h of fermentation in the “Ace spur” juice compared to 56 h in the “Kermerrien” juice. In other words, the yeast requires 27% more time to reach this phase in the latter case indicating an accelerated fermentation in the “Ace spur” juice. The indigenous yeast seems thereby to be more adapted to its native habitat.

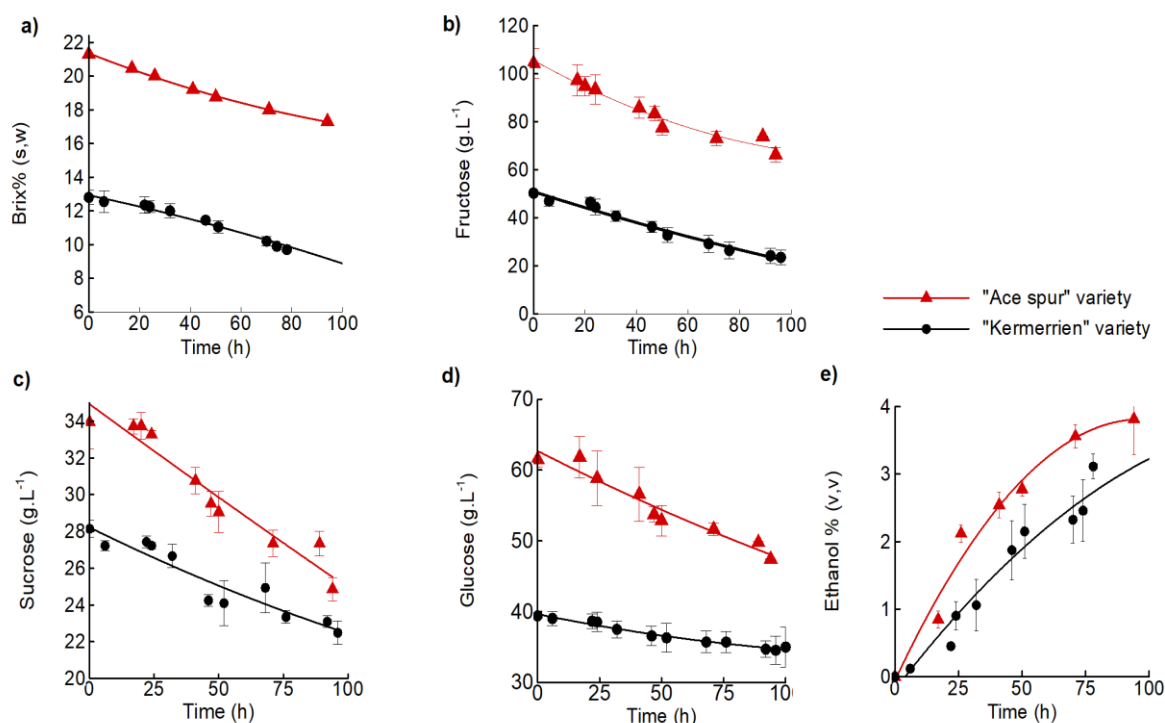




**Figure 1.** Growth kinetics of *Hanseniaspora* sp. in the Lebanese “Ace spur” and the French “Kermerrien” apple juices.

Results in figure 2 show that, after 100 h of fermentation, the alcohol content reached  $\approx 4\%$  (v/v) ( $\approx 31 \text{ g L}^{-1}$ ) in the Lebanese cider, compared to  $\approx 3.5\%$  (v/v) ( $\approx 27 \text{ g L}^{-1}$ ) in the French cider. Usually the final ethanol content in French ciders is less than 4%, fixed either by the regulation or by the consumers’ preferences (Jarvis 2003; Merwin 2008). For instance, an alcohol content of 5 % and 3.9% could be obtained, respectively, in fermented apple juice using hybrids of *Saccharomyces* sp. and a non-*Saccharomyces* sp. strain (Valles *et al.* 2005). Furthermore, the ethanol concentration obtained is similar to that obtained for the fermentations of Chinese apple juice using *Hanseniaspora osmophila* X25-5 (Wei *et al.* 2020). Thus, the ethanol percentages obtained in this work using the non-*Saccharomyces* yeast *Hanseniaspora* sp. seem to be acceptable for cider production. Nonetheless, there is a considerable controversy concerning the effect of *Hanseniaspora* sp. yeasts on the organoleptic quality. More volatile acidity, ethyl acetate and acetoin might be produced which can negatively influence the consumer preferences (Moreira *et al.* 2008). In parallel several studies showed the positive impact of these yeasts on the aroma profile of cider (de Arruda Moura Pietrowski *et al.* 2012). So, in order to evaluate the volatile compounds and aroma profile of the cider produced by the indigenous yeast *Hanseniaspora* sp., several organoleptic investigations are required.

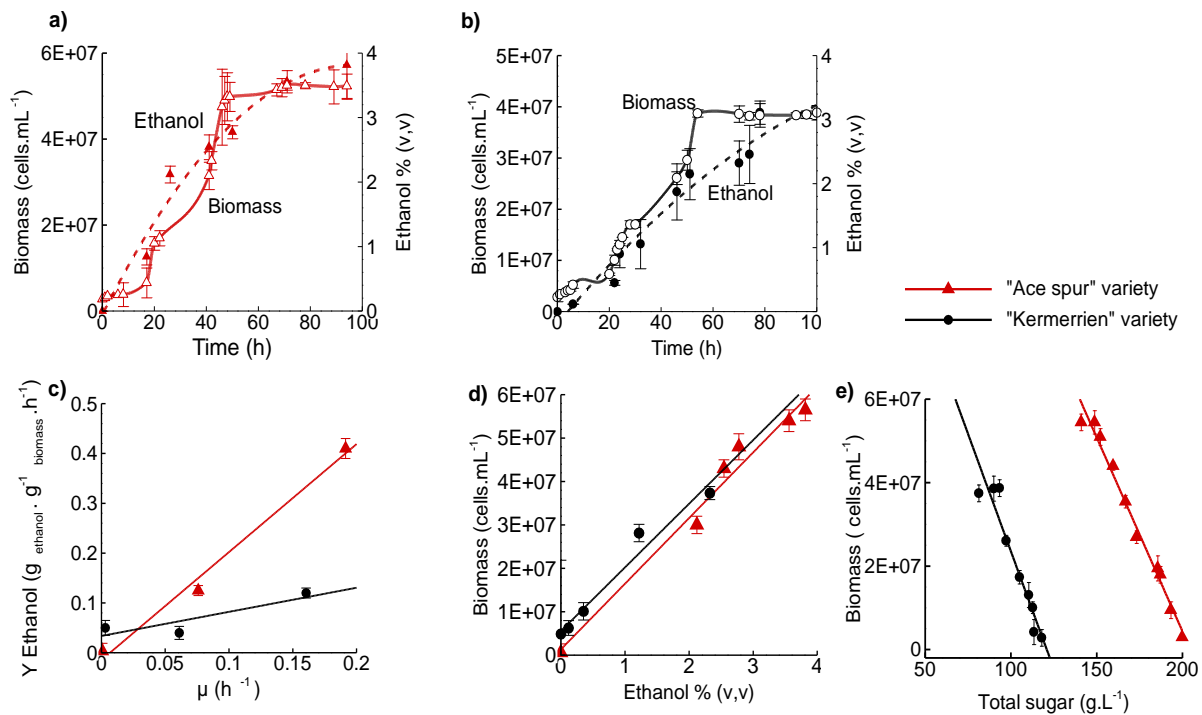
### 3. Résultats et discussions



**Figure 2.** Evolution of the % Brix (a), the fermentative sugars (b, c, d), and the ethanol production (e) during the fermentation of the juices obtained from the “Ace spur” and the “Kermerrien” varieties.

In addition, the results presented in figure 2 show that the yeast is able to assimilate glucose, fructose, and sucrose. The yeast consumed  $38 \text{ g L}^{-1}$  (36.5%) of fructose,  $9 \text{ g L}^{-1}$  (23.35%) of sucrose, and  $14.5 \text{ g L}^{-1}$  (26.51%) of glucose after 100 h of the “Ace spur” juice fermentation, hence, a total of  $61.5 \text{ g L}^{-1}$  (30%) of the total sugar present was then consumed. For the fermentation of the “Kermerrien” apple juice, the yeast consumed  $26.8 \text{ g L}^{-1}$  (53.28%) of fructose,  $5.7 \text{ g L}^{-1}$  (20.11%) of sucrose, and  $5.5 \text{ g L}^{-1}$  (13.96%) of glucose, hence, a total of  $38 \text{ g L}^{-1}$  (32%) of the total sugar in the juice was consumed after 100 h of fermentation. The highest sugar consumption observed in the “Ace spur” fermentation, may be due to its high rate of biomass and ethanol production during the “Ace spur” fermentation (Fig. 2.c). The study of the fermentation performance parameters may help to understand the behavior of the yeast in the two different juices (Fig. 3 and Table 2).

### 3. Résultats et discussions



**Figure 3.** The ethanol and biomass evolution during time in the “Ace spur” (a) and “Kermerrien” (b) apple juices, the relation between the specific rate of ethanol  $\gamma$  and the specific growth rate  $\mu$  (c), the biomass growth and the ethanol production (d), and the relation between the biomass growth and the sugar consumption (e), during "Ace spur" and "Kermerrien" apple juice fermentation.

Figure 3 shows that the growth of microorganisms and the production of ethanol seem to be correlated and strictly coupled. The results for the fermentation in the “Ace spur” juice presented that the ethanol production, which started from the first hours of fermentation, may be dependent to the cell growth (Fig. 3a, c & d). This observation concurs with [Al Daccache \*et al.\* \(2020b\)](#) where *Hanseniaspora* sp. used for cider production produces simultaneously ethanol and biomass from the first hours of fermentation. In addition, the specific rate of ethanol production increased proportionally to the specific growth rate during the exponential phase (Fig. 3 a & c). This phenomena was explained by [Gaden \(1959\)](#) who classified the mode of product formation regarding its relationship with the microorganism growth. The type I coupling is described when the biomass and the product concentrations evolve identically as seen in Figure 3c and 3d for the “Ace spur” juice. In this case the products seem to be directly derived from the metabolic energy generated by hydrocarbons ([Gaden 1959](#); [Sharma 2017](#)). These behaviors were not observed during the “Kermerrien” fermentation. Based on Gaden’s classification, it seems that the biomass growth and the ethanol production were connected by type II coupling during the fermentation of the “Kermerrien” apple juice (Fig. 3c). In this type of coupling, the cell growth occurs first, accompanied by low ethanol formation, which will increase during the fermentation (Fig. 3b, 3d, and 3e) ([Sharma 2017](#)). The specific rate of ethanol formation increased significantly during the stationary phase. Thus, in coupling type II the products may derive indirectly from the energy

### 3. Résultats et discussions

released by the metabolic reactions. This product may not come from the oxidative reactions of carbon, but from the reactions caused by the different interactions created between the metabolic products (Gaden 1959; Sharma 2017).

**Table 2.** Fermentation performance parameters in Lebanese “Ace spur” and French “Kermerrien” apple juices using the isolated strain *Hanseniaspora* sp., where  $Y_{X/G}$ ,  $Y_{X/F}$ ,  $Y_{X/S}$  are the biomass yields per gram of glucose, fructose, and sucrose, respectively, and  $Y_{E/G}$ ,  $Y_{E/F}$ ,  $Y_{E/S}$  represent the ethanol yields per gram of glucose, fructose, and sucrose, respectively.

	“Ace spur” variety	“Kermerrien” variety
$Y_{X/G}$ ( $g_{\text{biomass}} \cdot g^{-1}_{\text{glucose}}$ )	$0.07 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$
$Y_{X/F}$ ( $g_{\text{biomass}} \cdot g^{-1}_{\text{fructose}}$ )	$0.01 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$
$Y_{X/S}$ ( $g_{\text{biomass}} \cdot g^{-1}_{\text{sucrose}}$ )	$0.06 \pm 0.03$	$0.07 \pm 0.01$
$Y_{E/G}$ ( $g_{\text{ethanol}} \cdot g^{-1}_{\text{glucose}}$ )	$0.29^* \pm 0.09$	$0.57 \pm 0.11$
$Y_{E/F}$ ( $g_{\text{ethanol}} \cdot g^{-1}_{\text{fructose}}$ )	$0.08 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.02$
$Y_{E/S}$ ( $g_{\text{ethanol}} \cdot g^{-1}_{\text{sucrose}}$ )	$0.38^* \pm 0.15$	$0.50 \pm 0.10$
$\mu_{\text{max}}$ ( $h^{-1}$ )	$0.20^* \pm 0.02$	$0.16 \pm 0.01$
$\gamma_{\text{ethanol max}}$ ( $g_{\text{ethanol}} \cdot g^{-1}_{\text{biomass}} \cdot h^{-1}$ )	$0.30^* \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.02$

Nota: \* denotes significant differences

On the other hand, the difference between the two fermentations could be due to the considerable variations observed in the initial sugar concentrations present in the two juices (Fig. 3e). Some yeast species have the capacity to produce ethanol from sugar by anaerobic fermentation, even when the oxygen is present for an aerobic respiration. Whenever in the presence of a high sugar concentration, respiration is impossible, and the yeasts particularly metabolizes sugars by the fermentative pathway (Sarris and Papanikolaou 2016a). This key characteristic is known as the Crabtree effect (Pronk, Steensma and Dijken 1996). It has been also demonstrated that during the fermentation and in presence of high concentrations of sugars, the microbial growth and alcohol production occur during the first hours of fermentation, whereas in presence of a low concentration of sugar, the microbial growth is dominant (Crabtree 1929; Albergaria *et al.* 2003; Thierie and Penninckx 2010; Stanbury, Whitaker and Hall 2017). In addition, a study of different apple varieties has reported that after pressing, the dissolved oxygen is quickly used in the enzymatic browning reactions (Alberti *et al.* 2014). Therefore, both fermentations started with nearly the same oxygen concentration. In the presence of an excess of sugar, which is the case during the fermentation in the “Ace spur” juice, the yeast cells used the sugar in a less efficient way, which generates less energy by following the fermentative pathway (Fig. 3a) (Thierie and Penninckx 2010). However, in the case of the fermentation of “Kermerrien” cider apple juice, where the concentration of sugars is almost by half, the yeast cells were in a respiratory mode generating biomass instead of ethanol in the early hours of fermentation (Fig. 3b). The formation

### 3. Résultats et discussions

---

of ethanol seems to increase with the depletion of oxygen after hours of fermentation, thereby the switch to the anaerobic fermentation mode may occur. In this case, it appears that the indigenous *Hanseniaspora* sp. yeast strain could be Crabtree positive. These results concur with the study of Albergaria (2003), who investigated the physiological behavior of *Hanseniaspora guilliermondii*. Many strains such as *S. cerevisiae* used industrially in fermentation and for alcohol production undergo the Crabtree effect (Deken 1966; Habegger, Crespo and Dabros 2018).

Other differences have been observed in the biomass and product yields (Table 2). The highest ethanol yield obtained in the “Ace spur” cider was  $0.29 \pm 0.09 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ g}_{\text{glucose}}^{-1}$ , while in the “Kermerrien” one, it was of  $0.57 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ g}_{\text{glucose}}^{-1}$ . However, the ethanol yield during the “Kermerrien” fermentation could be over-estimated since the ethanol production doesn't occur from the first hours of fermentation (Sarris and Papanikolaou 2016b). These results concur with that presented by Quirós *et al.* (2014), who compared the fermentation of different yeast strains. The ethanol yield using glucose as substrate and *S. cerevisiae* as strain were of  $0.30$  and  $0.25 \text{ g g}^{-1}$ , whereas for the non-*Saccharomyces* yeasts, it was ranging from  $0.01$  to  $0.39 \text{ g g}^{-1}$ . Similarly, Contreras (2014) evaluated the efficiency of non-*Saccharomyces* yeasts for ethanol production. The results obtained showed that for *Hanseniaspora uvarum*, the ethanol yield varied between  $0.33$  and  $0.50 \text{ g g}^{-1}$ , whereas for *Hanseniaspora valbyensis* it was of  $0.06 \text{ g g}^{-1}$ . Even though both yields obtained during this study are suitable for ethanol production and cider fermentation, the production of ethanol is faster during the fermentation in the Lebanese “Ace spur” apple juice (Fig. 3c).

### 4. Conclusions

In this study, the use of Lebanese “Ace spur” apples for cider production was evaluated using an indigenous yeast strain. Based on ITS sequencing, the isolated strain was identified as member of the *Hanseniaspora* genus. Its fermentative potential was studied both in the juice of Lebanese “Ace spur” apples and in the French “Kermerrien” apples. The selected yeast strain has the capacity to ferment apple juice up to 4 % ethanol after 100 h. It metabolizes high sugar concentrations ( $200 \text{ g L}^{-1}$ ) and has a fermentative yield for ethanol production similar to that found in the literature. It has a faster biomass growth and ethanol production rates in the “Ace spur” apple juice fermentation than in the “Kermerrien” fermentation. Finally, the ethanol yields obtained showed that the selected *Hanseniaspora* sp. has the potential to be used for cider production. To summarize, the results obtained pave the way toward the use of the Lebanese “Ace spur” apple varieties for cider production by employing the isolated indigenous *Hanseniaspora* sp.

### Fundings

This work was supported by the Lebanese National Council for Scientific research (CNRS-FS129) and the Research council of Saint-Joseph University of Beirut, Project FS103.

#### References

- Albergaria H, Torrão AR, Hogg T *et al.* Physiological behaviour of *Hanseniaspora guilliermondii* in aerobic glucose-limited continuous cultures. *FEMS Yeast Res* 2003;**3**:211–6.
- Alberti A, Braga CM, Jaster H *et al.* Dissolved oxygen content in apple must : technological implications in cider processing. *JInst Brew* 2014;**120**:65–70.
- Alper I, Frenette M, Labrie S. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum* . *Fungal Biol* 2011;**115**:1259–69.
- Andrew LGH, Piggott JR. Cidermaking. *Fermented Beverage Production*. Second Edi. Kluwer Academic /Plenum, New York, 2003.
- de Arruda Moura Pietrowski G, dos Santos CME, Sauer E *et al.* Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. *J Agric Food Chem* 2012;**60**:9815–21.
- Buron N, Coton M, Legendre P *et al.* Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *Int J Food Microbiol* 2012;**153**:159–65.
- Cabranes C, Moreno J, Mangas JJ. Dynamics of Yeast Populations during Cider Fermentation in the Asturian Region of Spain. *Appl Environ Microbiol* 1990;**56**:3881–4.
- Camacho-Fernández C, Hervás D, Rivas-Sendra A *et al.* Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods* 2018;**14**:1–15.
- Concetta Compagno, Sofia Dahko JP. Introduction to carbon metabolism in yeast. *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London, 2014.
- Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA *et al.* Evaluation of non- *Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. 2014;**80**:1670–8.
- Contreras A, Hidalgo C, Schmidt S *et al.* The application of non- *Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int J Food Microbiol* 2015;**205**:7–15.
- Cousin FJ, Guellec R Le, Schlusshuber M *et al.* Microorganisms in fermented apple beverages: Current knowledge and future directions. *Microorganisms* 2017;**5**:39.
- Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 1929;**23**:536–45.
- Al Daccache M, Koubaa M, Salameh D *et al.* Control of the sugar / ethanol conversion rate during moderate pulsed electric field-assisted fermentation of a *Hanseniaspora* sp . strain to produce low-alcohol cider. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2020;**59**:102258.

### 3. Résultats et discussions

---

Dashko S, Zhou N, Compagno C *et al.* Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res* 2014;**14**:826–32.

Deken RHD. The Crabtree effect: A regulatory system in yeast. *J gen Microbiol* 1966;**44**:149–56.

Filippousi R, Antoniou D, Tryfinopoulou P *et al.* Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid. *J Appl Microbiol* 2019;**127**:1080–100.

Francesca Comitini, Gobbi M, Domizio P *et al.* Selected non- *Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiol* 2011;**44**:15–23.

Gaden EL. Fermentation process kinetics. *J Biochem Microbiol Technol Eng* 1959;**1**:413–29.

Gamero A, Quintilla R, Groenewald M *et al.* High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol* 2016;**60**:147–59.

Habegger L, Crespo KR, Dabros M. Preventing overflow metabolism in Crabtree-positive microorganisms through On-Line monitoring and control of Fed-Batch fermentations. *Fermentation* 2018;**4**, DOI: doi:10.3390/fermentation4030079.

Jarvis B. CIDER (CYDER; HARD CIDER): The Product and its Manufacture. In: Academic Press: Oxford U (ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Second. 2003, 1312–8.

Kurtzman CP, Mateo RQ, Kolečka A *et al.* Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS Yeast Res* 2015;**15**, DOI: doi: 10.1093/femsyr/fov050.

Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;**73**:331–71.

Lorenzini M, Simonato B, Slaghenaufi D *et al.* Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. *LWT* 2019;**99**:224–30.

Merwin IA. Cider Apples and Cider -Techniques in Europe and North America. *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)* 2008.

Morales ML, Fierro-Risco J, Ríos-Reina R *et al.* Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* co-inoculation on volatile profile in fermentations of a must with a high sugar content. *Food Chem* 2019;**276**:427–35.

Moreira N, Mendes F, Guedes de Pinho P *et al.* Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *Int J Food Microbiol* 2008;**124**:231–8.



### 3. Résultats et discussions

---

Morrissey WF, Davenport B, Querol A *et al.* The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J Appl Microbiol* 2004;**97**:647–55.

Pando Bedriñana R, Simón AQ, Valles BS. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol* 2010;**27**:503–8.

Pronk JT, Steensma HY, Dijken JP Van. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1996;**12**:1607–33.

Quirós M, Rojas V, Gonzalez R *et al.* Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int J Food Microbiol* 2014;**181**:85–91.

Rai AK, Pandey A, Sahoo D. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends Food Sci Technol* 2019;**83**:129–37.

Ratledge C. Yeast physiology - A micro-synopsis. *Bioprocess Biosyst Eng* 1991;**6**:195–203.

Rodrigues F, Ludovico P, Leão C. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *The Yeast Handbook*. 2006, 101–21.

Romano P, Suzzi G, Comi G *et al.* Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J Appl Microbiol* 1997;**82**:615–8.

Sarris D, Matsakas L, Aggelis G *et al.* Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. 2014;**56**:83–93.

Sarris D, Papanikolaou S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Eng Life Sci* 2016a;**16**:307–29.

Sarris D, Papanikolaou S. Biotechnological production of ethanol : Biochemistry , processes and technologies. 2016b:307–29.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:6241–6.

Selvakumaran J, Jell G. A guide to basic cell culture and applications in biomaterials and tissue engineering. In: Hench LL, Jones JR (eds.). *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. Woodhead Publishing, 2005, 215–26.

Sharma R. Products of fermentation. *Basic of Fermentation Technology*. 2017, 3–4.

Sievers F, Wilm A, Dineen D *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011;**7**:539.

Simon UK, Weiss M. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Mol Biol Evol* 2008;**25**:2251–4.

Stanbury P, Whitaker A, Hall S. *Principles of Fermentation Technology: Third Edition.*, 2017.

### 3. Résultats et discussions

---

Terpou A, Dimopoulou M, Belka A *et al.* microorganisms Effect of Myclobutanil Pesticide on the Physiological Behavior of Two Newly Isolated *Saccharomyces cerevisiae* Strains during Very-High-Gravity Alcoholic Fermentation. *Microorganisms* 2019;**7**.

Thierie J, Penninckx M. Crabtree Effect. *Encycl Ind Biotechnol Bioprocess, Biosep Cell Technol* 2010:1–17.

Tristezza M, Fantastico L, Vetrano C *et al.* Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *Int J Microbiol* 2014;**2014**, DOI: 10.1155/2014/897428.

Valles BS, Pando Bedriñana R, Tascón NF *et al.* Analytical differentiation of cider inoculated with yeast ( *Saccharomyces cerevisiae* ) isolated from Asturian ( Spain ) apple juice. *LWT - Food Sci Technol* 2005;**38**:455–61.

Valles BS, Pando Bedriñana R, Tascón NF *et al.* Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol* 2007;**24**:25–31.

Wei J, Zhang Y, Qiu Y *et al.* Chemical composition, sensorial properties, and aroma-active compounds of ciders fermented with *Hanseniaspora osmophila* and *Torulaspora quercuum* in co- and sequential fermentations. *Food Chem* 2020;**306**:125623.

Weiss S, Samson F, Navarro D *et al.* YeastIP: a database for identification and phylogeny of *Saccharomycotina* yeasts. *FEMS Yeast Res* 2013;**13**:117–25.

Zhao Y, Tsang C-C, Xiao M *et al.* Intra-Genomic internal transcribed spacer region sequence heterogeneity and molecular diagnosis in clinical microbiology. *Int J Mol Sci* 2015;**16**:25067–79.

#### 3.1.2. Etude des propriétés physicochimiques de la variété de pomme libanaise « Ace spur » et évaluation de son potentiel à la production du cidre à l'aide d'une souche de levure *Hanseniaspora* sp.

##### 3.1.2.1. Résumé de l'article

Les propriétés physicochimiques et fermentaires de la variété de pomme libanaise « Ace spur » et de la variété française de pomme à cidre « Kermerrien » ont été étudiées. Les propriétés pomologiques ont été d'abord déterminées pour les deux variétés, montrant des différences significatives dans les formes et les tailles. La variété « Ace spur » semble avoir des dimensions et un volume supérieurs à ceux de la variété « Kermerrien ». De plus, les formes diffèrent considérablement entre les deux variétés : une forme de section circulaire pour la variété « Ace spur » et ovoïde pour la variété « Kermerrien ».

La teneur en sucre, l'acidité titrable, les solides solubles des échantillons et le pH ont été déterminés. Les pommes « Ace spur » contiennent plus de sucres, tandis que la variété « Kermerrien » présente des concentrations plus élevées en acide malique et en composés phénoliques. Les sucres les plus abondants dans les pommes sont le fructose et le glucose. Les résultats obtenus ont montré que les concentrations de glucose et de fructose dans les deux variétés sont significativement différentes. Une différence significative a été observée entre les composés phénoliques totaux des deux variétés de pommes en moyenne de 419,83 et 514,13 mg GAE/ 100 g de matière sèche pour les variétés « Ace spur » et « Kermerrien », respectivement. Ceci pourrait être lié au fait que la variété « Kermerrien » est spécifiquement utilisée pour la production de cidre, qui devrait normalement être riche en composés phénoliques.

Par ailleurs, le potentiel du jus de pomme « Ace spur » pour la production du cidre a été évalué à l'aide de la souche de levure *Hanseniaspora* sp., et a été comparé à celui de la variété « Kermerrien ». Après 100 h de fermentation, le pourcentage d'éthanol (v, v) était d'environ 4% dans les deux cidres, ce qui a révélé le potentiel chimique du jus de pomme libanais pour la production de cidre. La levure isolée consomme plus de sucres lors de la fermentation du jus « Ace spur ». Le fructose était le sucre le plus consommé dans les deux fermentations, suivi par le glucose. Le suivi des différentes cinétiques de fermentation permet de conclure que quelle que soit la concentration initiale en sucre, le même pourcentage d'éthanol est atteint dans les deux jus après 100 h de fermentation. Les résultats obtenus dans cette étude permettent de montrer que la variété de pomme libanaise « Ace spur » a un potentiel chimique intéressant pour la production du cidre.

### 3. Résultats et discussions

---

#### 3.1.2.2. Article: Suitability of the Lebanese “Ace spur” apple variety for cider production using *Hanseniaspora* sp. yeast

*(Voir le manuscrit qui suit)*

#### **Suitability of the Lebanese “Ace spur” apple variety for cider production using *Hanseniaspora* sp. yeast**

Marina AL DACCACHE <sup>1,2</sup>, Mohamed KOUBAA <sup>3\*</sup>, Richard G. MAROUN <sup>2</sup>, Dominique SALAMEH <sup>2</sup>, Nicolas LOUKA <sup>2</sup>, Eugène VOROBIEV <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA 4297 TIMR, Centre de recherche Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne cedex, France

<sup>2</sup> Faculté des Sciences, Centre d'Analyses et de Recherche, UR TVA, Laboratoire CTA, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon.

<sup>3</sup> ESCOM, UTC, EA 4297 TIMR, 1 allée du réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France.

#### Abstract

(1) Background: In the present research work, the physicochemical and fermentative properties of the “Ace spur” apple variety, obtained from a Lebanese farm, and the “Kermerrien” variety, obtained from a French cider industry, were investigated. (2) Methods: The pomological properties were first determined for both varieties showing significant differences in the shapes and sizes. Sugar content, titratable acidity, soluble solids, and pH values were then determined. The potential of the “Ace spur” apple juice was then evaluated using the yeast strain *Hanseniaspora* sp., major yeast found during the spontaneous fermentation of apples. (3) Results: “Ace spur” apples contained more sugars while the “Kermerrien” cultivar had a highest malic acid and polyphenol concentrations. After 100 h of fermentation, the ethanol percentage (v,v) was around 4% in both ciders. (4) Conclusions: Results obtained in this work revealed the chemical potential of the Lebanese apple juice to produce cider.

**Keywords:** Lebanese apple; fermentation; cider; *Hanseniaspora* sp.; physicochemical properties

#### 1. Introduction

Apple represents one of the most produced and consumed fruits in the world. It is ranked as the third fruit produced worldwide with 77 million tons during the season of 2016-2017 [1]. It is a major fruit tree crop grown in the Mediterranean region [2]. “Ace Spur”, a dessert apple variety, represents one of the most important cultivars grown in the world [3]. In Lebanon, apple production is one of the active fruit-growing sectors. Despite most of the apples produced are either sold in the local market or exported, a big part of the apples remains unsold. Thus, processing and fermentation of the apple juices to produce beverages such as cider could be a promising perspective to exploit the potential of the unused apples. Nonetheless, the apple composition is one of the important factors to be considered as the aroma compounds usually define the quality of the fermented beverages. The content of these compounds could be affected by several factors including the apple variety, the fermentation conditions, and the yeast strain used [4–6]. Determining the physicochemical properties of apples before their use for fermentation processes is thus crucial to obtain a high product quality. Specific varieties of cider apples are grown and dedicated specifically for cider production. Based on their chemical composition, the different varieties of cider apples are divided into several categories. The “Kermerrien” variety is used during this study. The productivity of this variety is around 35-40 tons/ha in France. It is a bitter variety, characterized by a conical shape, and a green to red color. The flavor of the must deriving from is rather bittersweet and slightly fragrant, thus generating a bitter cider [7].

Apple sugar content could change depending on many factors such as the climatic factors including light, temperature, and moisture, as well as the cultivar and the maturity level of the fruit [8,9]. Mature apples are mainly composed of ≈85% water, 12-14% carbohydrates, 0.3-1.0% organic acids, 0.3% proteins, less than 0.1% lipids, as well as minerals and vitamins [10]. Fructose, glucose, and sucrose are the main sugars characterizing the fruit quality and the market value of apples [11,12]. Unlike other fruits, fructose content is significantly higher than that of glucose [13,14]. In a study of eight commercially growing apple varieties in China, the

### 3. Résultats et discussions

---

average contents of fructose, glucose, and sucrose were reported as 53.9 g/L, 33.8 g/L, and 24 g/L, respectively [15]. Besides, it was noted that the sensory characteristics of the product could be affected by the ratio of glucose and fructose. For instance, during the fermentation, the yeasts usually prefer to consume more glucose than fructose. Thus, a high fructose content in apple juice may affect the taste of the dry ciders after fermentation [16–18]. A total soluble solid content of 98.8% sugars represents a standard index of fruit ripening [19].

Soluble sugars and organic acids are important constituents contributing to the organoleptic properties of the fruits. They create with the flavoring substances the organoleptic quality related to the fresh apples [20]. L-malic acid is the major organic acid found in apples and its content closely correlates the titratable acidity. It is followed by the citric acid in a very lower concentration [21]. It has been also reported that apple fruit contains at least nine to twelve other organic acids in smaller fractions such as tartaric, quinic, shikimic, and succinic acids [15]. Apple acidity may vary from 0.1 to 2.5 g of malic acid per 100 g of juice [22]. The fruits growing in cool climate regions are usually more acidic than those growing in warmer regions [23].

The phenolic compounds' content has also an important effect on the sensory properties (e.g. color, bitterness, and astringency) of apple ciders. They could be involved in the fermentative process, providing the cider aroma, and as inhibitors of the microorganism growth [24]. In addition, they can influence the sweetness and the sourness, and therefore may affect the overall flavor development during the fermentation process [25,26]. Several types of phenolic compounds are found in apple cultivars, specifically, hydroxycinnamic acid derivatives, monomeric and oligomeric flavan-3-ols, dihydrochalcones, and flavonols [27]. Moreover, differences in the polyphenolic profile may occur between apple varieties and the final phenol content may depend on several factors such as the maturity of the fruit, the harvest year, climate conditions, cultivation, and storage conditions [24,27].

Other important parameters to take into account for apple processing are the fruit size and shape. They are essential for the equipment design for handling, transporting, cleaning, sorting, grading, and processing of the fruit [28].

Besides the chemical composition, the selection of yeast has a significant impact on fermentation. Different yeasts may be present during the first stage of fermentation, giving way to another type of yeast, now called *Saccharomyces cerevisiae* [29]. This yeast is widely used during fermentation due to its controlled and repetitive behavior as well as for the release of its aroma precursors. The role of non - *Saccharomyces* yeasts appears to be important during the fermentation process. These species are characterized by a low fermentation capacity and are sensitive to an alcohol concentration close to 5 or 6% [30]. The positive impact of *Hanseniaspora* sp. in alcoholic fermentation has been demonstrated, which may positively contribute to the aroma profile of the fermented apple juice, thereby accentuating the beneficial role of these yeasts [31,32]. The species of the genus *Hanseniospora* are characterized by an apiculate form and are present at the beginning of spontaneous fermentation [33–37].

The review of the literature shows that the information about the physicochemical properties of the Lebanese apples and their potential to produce cider by fermentation is very

limited. In this line, this study aimed to determine the physical properties and chemical composition of one Lebanese apple variety; “Ace spur”, as well as its potential for cider production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Apples and chemicals

Two apple cultivars (“Ace spur” and “Kermerrien”) were used in this study. The “Ace spur” apples were collected from Bqaatouta village (Keserwan region, Lebanon) and it was chosen due to its high availability in the Lebanese market. In fact, previous studies have shown the great potential of this variety for cider production. The “Kermerrien” variety was kindly provided by the IFPC (“Institut Français des Productions Cidricoles”) located in “Le Rheu” city (France). This variety is traditionally cultivated for the industrial cider production. The apples were brought during the same harvest period (2017/2018 season) to minimize the errors due to the apple storage and ripening. They were stored at 4 °C until use.

Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), and peptone were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Gallic acid, malic acid, Folin-Ciocalteu phenol reagent, trolox, and yeast extract were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Fructose, sucrose, and glucose were supplied by Merck Millipore (Guyancourt, France). Sodium carbonate was bought from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).

### 2.2. Determination of the apple properties

#### 2.2.1. Determination of the size and shape properties

##### 2.2.1. Determination of the size and shape properties

The experiments were performed in triplicate over 25 different apples taken from each variety. First, the fruit weight (g) was measured using a monobloc Mettler Toledo PB3002-S precision balance (Aldrich, Germany). After this step, the polar (L), suture (W), and equatorial (T) diameters (Figure 1) of each apple were measured using a digital vernier caliper (Athol, MA, USA).

The measurement of these three dimensions allowed the calculation of the following parameters [40,41].

The elongation E (Equation (1)):

$$E = \frac{T}{L} \quad \text{Equation (1)}$$

The “size” or the arithmetic mean diameter:  $Da$  (mm) (Equation (2)).

$$Da \text{ (mm)} = \frac{T+L+W}{3} \quad \text{Equation (2)}$$

The geometric mean diameter:  $Dg$  (mm), and the equivalent diameter:  $De$  (mm) were calculated using equations (3) and (4) [42]



### 3. Résultats et discussions

$$Dg \text{ (mm)} = \sqrt[3]{L \cdot W \cdot T} \quad \text{Equation (3)}$$

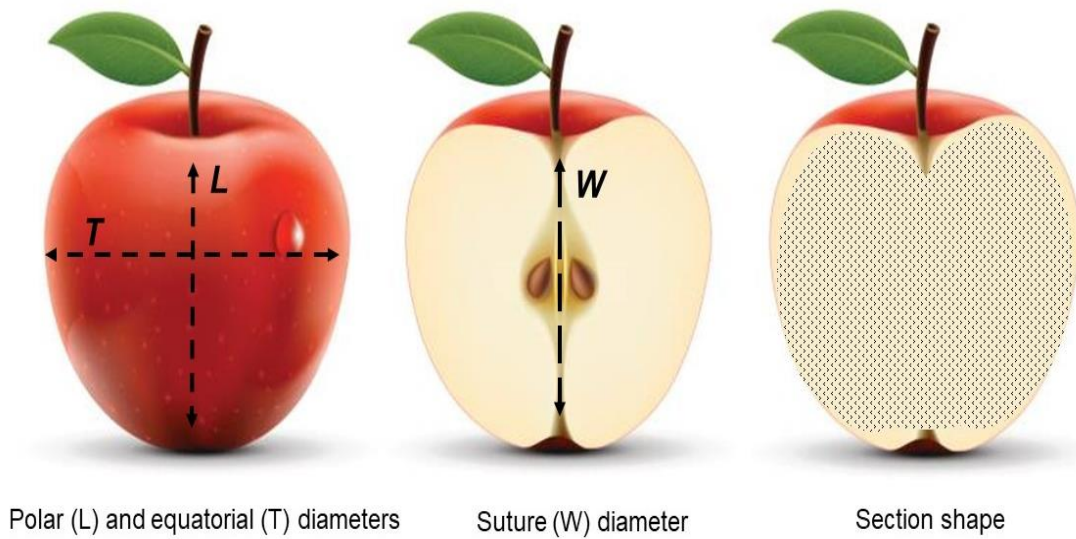
$$De \text{ (mm)} = \left( \frac{L \cdot (W+T)^2}{4} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Equation (4)}$$

The surface area:  $S$  ( $\text{mm}^2$ ) was calculated from equation (5)

$$S \text{ (mm}^2\text{)} = \pi \cdot T \cdot \left( L + \frac{T}{2} \right) \quad \text{Equation (5)}$$

The fruit volume:  $V$  ( $\text{mm}^3$ ) was calculated according to equation (6) [43]:

$$V \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{\pi \cdot L \cdot W \cdot T}{6} \quad \text{Equation (6)}$$



**Figure 3.1.** Schematic representation of the apple size and shape determination.

#### 2.2.2. Mechanical analyses

##### 2.2.2.1. Relaxation test

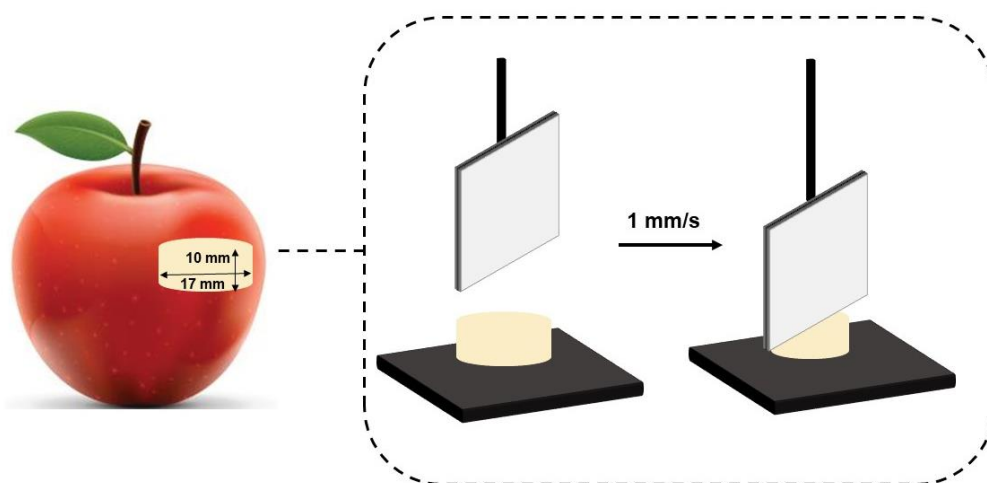
Relaxation tests were conducted at room temperature in order to quantify and qualify the viscous phenomena and the resistance within the products [44]. The tests were carried out using a texture analyzer (TA-XT plus, Rhéo, Champlan, France) consisting of a force sensor, a pressing piston, and a computer that allows the acquisition, the recording of measurements, and the data processing. The samples were prepared in sliced form of 1.7 cm diameter and 1 cm thickness using a cylindrical punch tool. A force of 10 N and a displacement speed of 1 mm/s with a maximum deformation of 10% (1 mm) were applied.

##### 2.2.2.2. Cutting/slicing test

The goal of this test is to compare the force required for cutting or slicing a product. The device used was the same texturometer described above (TA-XT plus, Rhéo, Champlan, France), equipped with a sharp blade. During this test, a movement speed of 1 mm/s was

### 3. Résultats et discussions

imposed (Figure 2). The samples were prepared in the sliced form of 1.7 cm diameter and 1 cm thickness. The strength necessary to cut the product to 50% of its initial thickness was delivered.



**Figure 3.2.** Schematic representation of the cutting test procedure.

#### **2.2.3. Determination of the water content in apples**

The apples were cut into small cubes ( $\approx 2$  cm) from different fruit parts (pulp, center cut, pulp, and skin). The water content in apple slices was determined using an infrared dryer (Sartorius MA150, France). The principle consists of heating the sample at  $105$  °C until obtaining a constant weight. The test was performed in triplicate for each variety.

#### **2.3. Determination of the biochemical properties**

Randomly 5 kg of apples were chosen from  $\approx 300$  kg. The apples were first washed and then used to extract the juices at room temperature using a fruit juice centrifuge separator (Moulinex, France). The biochemical properties, detailed in the following sections, were determined immediately after juice extraction. All measurements were repeated at least using three replicates.

##### **2.3.1. Titratable acidity**

The titratable acidity represents the total acid content in apple juice and was expressed as malic acid equivalent. The titratable acidity was calculated as the average of 5 measurements (each of 100 mL diluted juice) with a 0.1 N NaOH solution.

##### **2.3.2. pH measurement**

The pH of the juice was determined with a Mettler Toledo (MP 220) pH meter.

##### **2.3.3. Total soluble solids (Brix % (s,w))**

Aliquots of both juices were taken to measure the total soluble solids using a digital refractometer (Anggur DR401, France) [45].

##### **2.3.4. Analysis of the total polyphenol content**

The total polyphenol content was determined for both apple juice varieties. The Folin-Ciocalteu colorimetric method was used [46]. First, 1 mL of 10-fold diluted Folin-Ciocalteu reagent was

### 3. Résultats et discussions

---

added to 0.2 mL of the juice. Then, 0.8 mL of sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (75 g/L) solution was added and the mixture was incubated at 60 °C for 10 min. After cooling to room temperature, the absorbance was measured at 750 nm using a UV-vis spectrophotometer (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, USA). A calibration curve was established using gallic acid solutions (concentrations ranging from 0.2 to 1 mg/mL), and the polyphenols' content was expressed as mg of gallic acid equivalent per 100 g of dry matter.

#### 2.3.5. Determination of the free radical scavenging activities

The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical was used to determine the free radical scavenging activity of each apple juice variety [47]. A juice sample of 50  $\mu\text{L}$  was mixed with 1450  $\mu\text{L}$  of 0.06 mM DPPH free radical prepared in methanol solution. After 30 min incubation at room temperature, the reduction of the DPPH free radical was measured by reading the absorbance at 517 nm. The DPPH free radical scavenging activity was measured using a spectrophotometer UV-vis (Libra S32, Biochrom, France). Trolox, as a synthetic antioxidant, was used as a positive control and the percentage of inhibition was calculated according to equation (7).

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of test sample}}{\text{Absorbance of control}} \quad \text{Equation (7)}$$

#### 2.4. Determination of the fermentative capacity

The evolution of the fermentative capacity of the Lebanese apple juice (“Ace Spur” variety) was performed using the yeast strain *Hanseniaspora* sp. This strain belongs to the authors’ laboratory collection (Saint Joseph University, Beirut, Lebanon) [48]. This indigenous yeast strain was previously isolated from a spontaneously fermented juice of the Lebanese apple variety “Ace spur”. In fact, the genus *Hanseniaspora* was found as a major yeast developed during spontaneous apple juice fermentation [49,50]. The sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) domain of ribosomal DNA (SUB6436410 Hsp\_E2MN648725) identified the isolated yeast strain as a member of the *Hanseniaspora* genus. First, a pre-culture was performed by taking one colony of the strain from YPD agar (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose, and 2 % agar) plate into 250 mL of liquid YPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose) medium at pH 3.5 under sterile conditions (20 min at 121 °C in an autoclave HMC HV-110L (HMC Europe GmbH, Germany)). The cultivation was performed during 24 h at 30 °C temperature, and 250 rpm agitation speed in a thermostatic shaker (Thermo Scientific, France). A volume of 1.5 L of apple juice was introduced into a 2-L sterile fermenter and inoculated by the pre-culture to get an initial concentration of  $3.0 \times 10^6$  cells/mL. The cultivation was performed in triplicate at 30 °C and 250 rpm. Samples were periodically taken during the fermentation process for yeast cell counting. Several dilutions were made in ultrapure water, and the cells were counted using a Thoma cell counting chamber (Preciss, France). The biomass concentration X (cells/mL) was calculated according to equation (8), where a is the number of cells counted, d is the dilution factor, b is the number of squares counted in the chamber, and 250000 corresponds to a constant included in the formula of the

### 3. Résultats et discussions

---

Thoma cell. To detect the viable cells, the samples were mixed volume to volume with a solution of 0.01% methylene blue.

$$X \text{ (cells/mL)} = \frac{n \cdot 250000 \cdot d}{N} \quad \text{Equation (8)}$$

The ethanol production during the fermentation process was determined by the specific gravity measurements using a 5-mL glass pycnometer (Thermo Fisher, France). For ethanol quantification, a calibration curve was prepared using reconstituted solutions of apple juice/ethanol (1-10%, v/v).

The concentrations of carbon substrates (fructose, glucose, and sucrose) were determined using high-performance liquid chromatography instrument LC-20AD (Shimadzu, Japan). The separation was performed in isocratic mode (a mixture of 1:4 (20:80) (v:v) water:acetonitrile with a flow rate of 3 mL/min), and using a Luna 5  $\mu\text{m}$   $\text{NH}_2$  250 x 4.6 mm column. The separation temperature was set to 40 °C and the eluted molecules were detected using a low-temperature evaporative light scattering detector ELSD-LT II (Shimadzu, Japan). The samples taken during the fermentation processes were diluted 10 times in ultrapure water, and a volume of 1  $\mu\text{L}$  was injected. The compounds' assignment and quantification were performed using pre-established standard curves of glucose (5-30 g/L), fructose (2.5-30 g/L), and sucrose (2-10 g/L). The kinetics of growth, ethanol production, and substrate consumption were compared to those obtained for the fermented "Kermerrien" juice, performed under the same conditions.

#### 2.5. Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was used for the statistical analysis of the data with the help of Statgraphics Plus software (version 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Significance level at 95% confidence was taken for each analysis. The values presented in the figures correspond to the mean value of the repetition, and the error bars correspond to the standard deviations of each measurement.

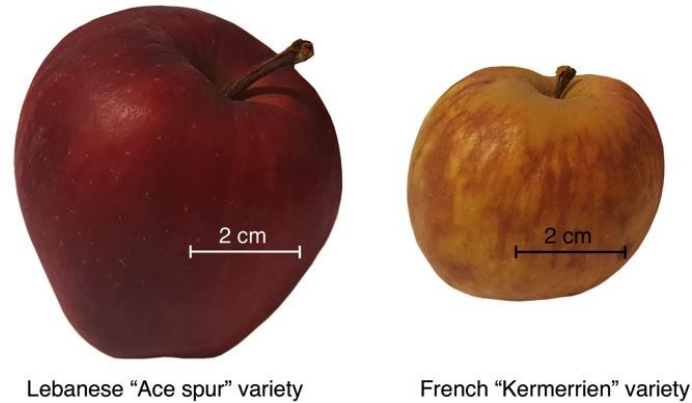
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Apple pomological properties

The choice of variety and the knowledge of the cultivar composition allow establishing the sensory quality of the apple juice. The data presented in table 1 show significant differences in the fruits' properties. The "Ace spur" variety seems to have a bigger size ( $56.72 \pm 3.44$  mm vs  $44.10 \pm 1.83$  mm), volume ( $174.1 \pm 4.8$  cm<sup>3</sup> vs  $49.22 \pm 8.2$  cm<sup>3</sup>), and weight ( $117.13 \pm 20.01$  g vs  $60.57 \pm 8.34$  g) compared to that of the "Kermerrien" apple. Besides, the shapes are significantly different between the two varieties: a circular section shape for the "Ace spur" variety ( $E \approx 1$ ), and ovoid for the "Kermerrien" one ( $E > 1$ ) (Figure 3). In fact, it has been reported that the elongation might depend on the cultivar and the orientation of the fruit in the space [51]. In the current study, the two varieties of apples chosen came from two different regions. The "Ace spur" variety is mainly dedicated to daily consumption where the appearance of the apple has an essential role, whereas the "Kermerrien" variety is a cider apple cultivated to produce cider and is not consumed as a dessert apple. Figure 3 shows that the "Ace spur" variety has a more attractive appearance, which is important for commercial reasons, while

### 3. Résultats et discussions

“Kermerrien” apples are grown exclusively for processing. Those apples have some imperfections, such as skin blemishes or off shapes (Figure 3), making them undesirable for the fresh market. The fruit size and shape could also be a tool to distinguish the fruits from each other. These properties can also be exploited to determine the parameters for postharvest, sorting, and processing. It should be also integrated in the design of equipment.



**Figure 3.** Morphological aspects of the Lebanese “Ace spur” and the French “Kermerrien” apple varieties.

Extracting and milling the apples for apple juice recovery are essential operations during the first steps of the cider production process [52]. Apple pressing and crushing require a certain force, thus the design of the machines and presses will be manufactured according to this force to obtain an optimum yield of juice. The needed force to rupture the “Ace spur” apples was lower than that of the “Kermerrien” one (Table 1). This indicates that the Lebanese variety has a softer tissue compared to that of the French one. Nonetheless, the force required to cut the apples was the same for both varieties. Furthermore, the results in table 1 show that the “Ace spur” apples had slightly lower water content than the “Kermerrien” apples ( $82.34 \pm 2.1 \%$  vs  $84.15 \pm 1.5 \%$ ). Water content is related to the texture and apple firmness. It may depend on the total soluble solids present in each variety. The lowest water content observed in the “Ace spur” apples concurs with the high total soluble solids ( $20.57 \pm 1.80 \text{ g/100 mL}$ ) found (Table 2).

**Table 1.** Average fruit weight, linear dimensions, size, elongation, and rheological properties of 25 apples taken from “Ace spur” and “Kermerrien” varieties.

Apple variety	“Ace spur”	“Kermerrien”
Average weight (g)*	$117.13 \pm 20.01$	$60.57 \pm 8.34$
Equivalent mean diameter $D_e$ (mm)*	$56.72 \pm 3.44$	$44.10 \pm 1.83$
Mean size $D_a$ (mm)*	$56.76 \pm 3.34$	$44.12 \pm 1.62$
Mean elongation $E$	$1.05 \pm 0.07$	$1.14 \pm 0.2$
Mean Surface area $S$ (cm <sup>2</sup> )	$180.14 \pm 5.4$	$119.17 \pm 3.7$
Mean fruit volume $V$ (cm <sup>3</sup> ) *	$174.1 \pm 4.8$	$49.22 \pm 8.2$
Water content (%)	$82.34 \pm 2.1$	$84.15 \pm 1.5$
Compression force (N)*	$64.88 \pm 15.7$	$118.37 \pm 20.5$
Rupture force (N)	$14.85 \pm 1.87$	$14.57 \pm 2.5$

The \* denotes significant differences



#### 3.2. Apples composition

The most abundant sugars in apples are fructose and glucose [4]. They represent 81% of the total sugars in the “Ace spur” and 74% in the “Kermerrien” variety. The results obtained (Table 2) showed that the concentrations of glucose and fructose in the two varieties are significantly different. Even more, the fructose/glucose ratio was greater for the “Ace spur” variety ( $1.83 \pm 0.08$ ) than that of the “Kermerrien” one ( $1.45 \pm 0.05$ ). Besides, the results showed also a strong positive correlation between the total sugar content and the total soluble content ( $^{\circ}$ Brix), though the sucrose concentration was the same for both varieties (Table 2). The fructose concentration in the “Ace spur” variety was relatively high compared to the values found in the literature. The “Kermerrien” variety is considered as a bitter apple cider having a relatively low sugar concentration. In fact, different fructose concentrations were found in the literature. In a study of eight apple varieties obtained from the Polish market, a range of fructose concentration between 82.2 and 59.3 g/L, and an average of 23.15 g/L of glucose concentration were reported [53]. In the Latvian apples, the fructose content ranged from 23.5 to 66.91 g/L, while the glucose concentration ranged from 7.47 and 60.24 g/L [54]. Several authors have investigated the relationship between apple sweetness and its properties. For example, a relationship is demonstrated between apple sweetness and texture properties [55] or apple color [56]. A great difference in the textures and colors of the two varieties is discussed above and shown in table 1 and figure 3. The texture differences may justify the significant differences in the sugar concentrations between the “Ace spur” and “Kermerrien” apples.

However for cider production, usually apple cider varieties contain 11% of glucose, 74% of fructose, and 15% of sucrose [4]. Lea and Drilleau, described the “ideal” composition of apple juice for cider production and categorized the apple cider varieties into four groups depending on the concentration of sugars, organic acids, and phenolic compounds [8]. The “Ace spur” variety containing high sugar concentrations should be belonging to the “sweet” apple varieties. Furthermore, the comparison of the sugar content in the “Ace spur” variety to that of the “ideal” apple juice showed that the fructose and sucrose concentrations matched [8]. The glucose concentration was higher in the “Ace spur” variety with a slightly lower acid concentration, which means that the cider from the “Ace spur” variety could be sweeter than the cider from the “Kermerrien” apples. Yet, if an ideal composition is sought for the production of cider, different varieties of apples should be used.

Furthermore, a significant difference was observed between the total phenolic compounds of the two varieties ( $419.83 \pm 8.32$  and  $514.13 \pm 13.75$  mg GAE / 100 g dry matter, for “Ace spur” and “Kermerrien” varieties, respectively) (Table 2). This could be related to the fact that the “Kermerrien” variety is specifically used for cider production, which should normally be rich in phenolic compounds [57,58]. Thus, for a good cider quality, it is important to note that the “Ace spur” apples should contain a relatively high phenolic compounds' content, which was comparable to that found in the “Kermerrien” variety. In fact, the color, astringency, bitterness balance, and other sensory properties (e.g. aroma and fruitiness) of cider depend on the concentration of phenolic compounds [54].

The antioxidant activity was slightly higher for the “Kermerrien” variety ( $95.97 \pm 0.5\%$ ) compared to “Ace spur” ( $93.15 \pm 0.87\%$ ) (Table 2). This could be correlated to the phenolic compounds content, as previously demonstrated [59]. In addition, even though the TPC is

### 3. Résultats et discussions

lower for the “Ace spur” variety, the polyphenolic compounds present similar antioxidant activity than that of apple cider (Table 2). In another study, it has been reported that a blended cider was ranking higher for acidity and flavor compared to a single cultivar (doesn't contain the ideal characteristics for a fermented cider). A blend containing both dessert and specific cider cultivars ranked highest for sweetness, appearance, and flavor [60].

**Table 2.** Physicochemical apple juice composition of “Ace spur” and “Kermerrien” varieties

Apple variety	“Ace spur”	“Kermerrien”
Glucose (g/L) *	55.69 ± 1.54	39.80 ± 1.60
Fructose (g/L) *	101.41 ± 4.08	57.84 ± 1.98
Sucrose (g/L)	35.98 ± 1.89	34.59 ± 1.23
Total sugar content (g/L) *	193.08 ± 7.51	132.32 ± 4.81
Fructose – Glucose ratio*	1.83 ± 0.08	1.45 ± 0.05
°Brix (g/ 100 mL)*	20.57 ± 1.80	13.57 ± 0.80
Titrateable acidity (g malic acid /L) *	2.93 ± 0.66	15.28 ± 1.90
pH*	4.90 ± 0.08	3.59 ± 0.09
Total phenolic content (mg GAE / 100 g dry matter) *	419.83 ± 8.32	514.13 ± 13.75
Total antioxidant activity (%) *	93.15 ± 0.87	95.97 ± 0.5

The \* denotes significant differences, GAE denotes Gallic Acid Equivalent

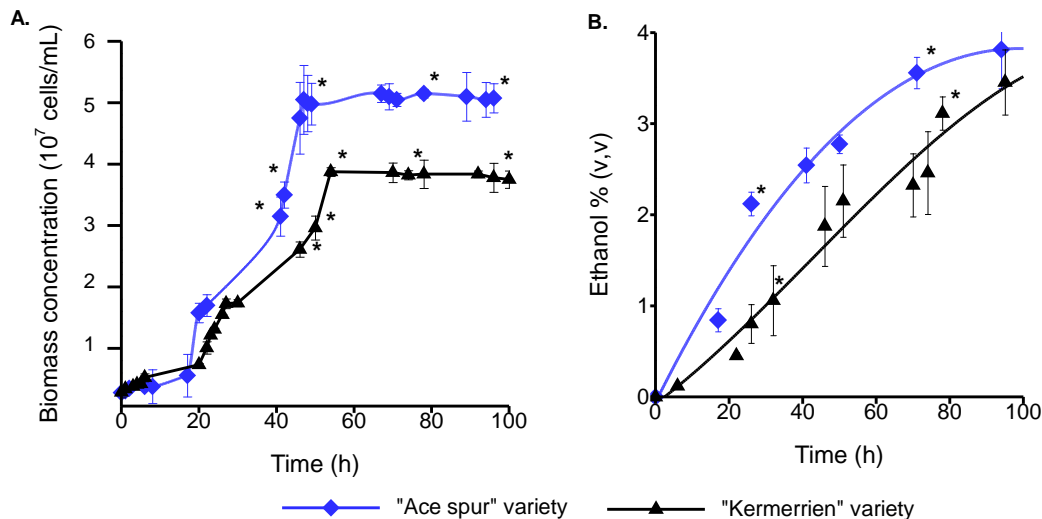
#### 3.3. Fermentative potential of the Lebanese apple juice

The fermentative capacity of the Lebanese “Ace spur” apple juice was evaluated using *Hanseniaspora* sp. yeast strain and compared to that obtained from “Kermerrien” variety. The kinetics of growth, ethanol production, and substrate consumption were recorded during the fermentation (Figures 4 and 5).

Results in figure 4.A. show that *Hanseniaspora* sp. can grow in the apple juice with distinguishable latency, exponential and stationary phases. The evolution of the biomass concentration over time indicates that the yeast growth takes place following a typical fermentative kinetic. The concentration of microorganisms reached a maximum of  $5 \times 10^7$  cells/mL and  $3.8 \times 10^7$  cell/mL for the “Ace spur” and the “Kermerrien” fermentations, respectively. In figure 4.B, the maximum ethanol percentage of  $\approx 3.8$  % (v/v) reached after 100 h of the “Ace spur” juice fermentation was not significantly different from that of the “Kermerrien” variety ( $\approx 3.5$  %). In fact, the final ethanol content in French ciders is usually less than 4%, fixed either by the regulation or by the consumers' preferences [61,62]. This content is variable from a country to another. In fact, different samples taken from Scotland's cider varieties were tested and the alcoholic strengths varied in a range of 4.1 to 7.4% volume [63]. Therefore, the ethanol percentage obtained in this work for the “Ace spur” variety seems to be acceptable for cider production.

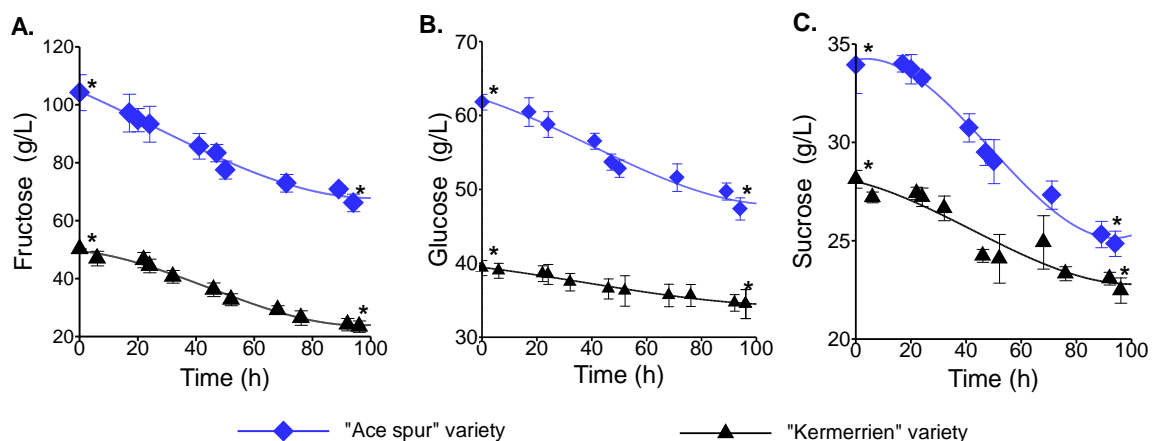


### 3. Résultats et discussions



**Figure 4.** Kinetics of growth (A) and ethanol production (B) of *Hanseniaspora* sp. fermentation in “Ace Spur” and “Kermerrien” apple juices. Continuous lines are provided to guide the eye. “\*” denotes significant differences.

During the Lebanese “Ace spur” fermentation, the yeast consumed 61.5 g/L of the total sugar content after 100 h of fermentation, divided as follows: 38 g/L (36.5%) of fructose, 14.5 g/L (26.51%) of glucose, and 9 g/L (23.35%) of sucrose. For the fermentation of the “Kermerrien” apple juice, the yeast consumed 26.8 g/L (53.28%) of fructose, 5.5 g/L (13.96%) of glucose and 5.7 g/L (20.11%) of sucrose, thus 38 g/L of the total sugar in the juice was consumed after 100 h of fermentation (Figure 4). The yeast consumed therefore more sugars during the “Ace spur” juice fermentation. Fructose was the most consumed sugar in both fermentations followed by glucose. The fructose-glucose consumption ratio was 2.62 and 4.87 for the “Ace spur” and “Kermerrien” fermentations, respectively. Thus, the indigenous yeast seems to have a fructophilic character. This behavior was observed for the strain *Hanseniaspora uvarum* that didn’t show any preference for glucose consumption [64].



**Figure 5.** Evolution of the fermentative sugars during the fermentation of the juice obtained from the “Ace Spur” and “Kermerrien” varieties. “\*” denotes significant differences between the initial concentrations of the juice and after 100 h of fermentation.

### 3. Résultats et discussions

---

The follow-up of the different fermentative kinetics (Figures 4 and 5) shows that regardless of the initial sugar concentration, the same ethanol percentage is reached in both fermentations after 100 h. A closer look shows that different biomass and ethanol kinetics were obtained. The differences could be due to the significant variations observed in the initial sugar concentrations present in the two juices. In the presence of an excess of sugar, which is the case during the fermentation in the “Ace spur” juice, the yeast cells followed the fermentative pathway from the first hour of fermentation, generating both biomass and ethanol [65] (Fig. 4). Nevertheless, for the fermentation of “Kermerrien” apple juice, where the concentration of sugars is practically by half ( $\approx 110$  g/L), the cells were in a respiratory mode generating biomass in the early hours of fermentation. The formation of ethanol seems to increase with the exhaustion of oxygen after hours of fermentation, thus the shift to the anaerobic fermentation mode may occur (Fig. 4). Furthermore, the total sugar consumptions were strongly different. The yeast cells used the sugar less efficiently during the “Ace spur” fermentation, which produces a reduced amount of energy by following the fermentative pathway [65]. Thus, the yeast consumed more total sugars during this fermentation (Fig.4). Despite this higher consumption of sugars, the "Ace spur" cider may contain more total sugars making it sweeter than "Kermerrien" one.

### 5. Conclusions

In conclusion, the obtained results showed that the apple varieties “Ace spur” and “Kermerrien” had different pomological properties and chemical compositions. The “Ace spur” variety, a dessert apple, had a bigger size and a circular shape, while the “Kermerrien” variety; a cider apple had an ovoid shape with some imperfections. The “Ace spur” apples have a high sugar concentration, specifically a high fructose concentration ( $\approx 100$  g/L). The “Kermerrien” apples contained on the other hand had high polyphenolic compounds content (514.13 mg GAE / 100 g dry matter). The yeast strain *Hanseniaspora* sp. was able to ferment the “Ace spur” apple juice up to  $\approx 3.8\%$  of ethanol after 100 h of fermentation, which was comparable to that of the “Kermerrien” variety. The same ethanol content was reached regardless of the initial sugar concentration and the quantity of sugars consumed during both fermentations. The Lebanese “Ace spur” apple variety has the potential to be used for cider production due to its suitable chemical composition, its appropriate texture for industrial processing and the suitable ethanol content obtained after 100 h of fermentation. Nonetheless, further investigations are required to evaluate the volatile organic compounds and the aromatic profile of the obtained ciders.

### Acknowledgments

The authors wish to thank the Research council of Saint-Joseph University of Beirut, Project FS103 and the Lebanese National Council for Scientific research (CNRS-FS129). All the authors thank Dr. Nicolas Thiebault as well for his help in performing the HPLC analyses at ESCOM-Chimie (Compiègne, France).

#### References

1. USDA Fresh deciduous fruit: World markets and trade (apples, grapes & pears) 2018.
2. Wilkie, J.D.; Sedgley, M.; Olesen, T. Regulation of floral initiation in horticultural trees. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3215–3228.
3. Al-Absi, K. Thinning intensity of ‘Ace Spur Delicious’ and “Idared” apples with ethephon, benzyladenine and their combination. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* **2009**, *5*, 237–250.
4. Beech, F.W. Cider making and cider research: A review. *Journal of the Institute of Brewing* **1972**, *78*, 477–491.
5. Hidalgo, P.; Pueyo, E.; Pozo-Bayón, M.A.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Martín-Alvarez, P.; Polo, M.C. Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6640–6645.
6. Martínez-Rodríguez, A.J.; Polo, M.C. Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry* **2003**, *81*, 383–388.
7. Institut Français des productions cidricoles Pomme à cidre: les variétés 2009.
8. Lea, A.G.H.; Drilleau, J.-F. Cidermaking. In *Fermented beverage production*; Lea, A.G.H., Piggott, J.R., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2003; pp. 59–87.
9. Kvåle, A. Composition and quality of gravenstein apples as related to some environmental factors. *Acta Agriculturae Scandinavica* **1969**, *19*, 229–239.
10. Ministerio de Salud del Perú, Centro nacional de alimentación y nutrición Tablas peruanas de composición de alimentos 2009.
11. Knee, M. “Pome fruits.” In *Biochemistry of fruit ripening*; Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker, G.A., Eds.; Chapman & Hall: London, UK, 1993; pp. 325–346.
12. Baldwin, E.A. Fruit flavor, volatile metabolism and consumer perceptions. In *Fruit Quality and its Biological Basis*; Knee, M., Ed.; CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 2002; pp. 89–106.
13. Sánchez-Moreno, C.; Pascual-Teresa, S.D.; Ancos, B.D.; Cano, M.P. Nutritional values of fruits. In *Handbook of fruits and fruit processing*; Hui, Y.H., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2007; pp. 29–43 ISBN 978-0-470-27773-7.
14. Sanz, M.L.; Villamiel, M.; Martínez-Castro, I. Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chemistry* **2004**, *87*, 325–328.
15. Wu, J.; Gao, H.; Zhao, L.; Liao, X.; Chen, F.; Wang, Z.; Hu, X. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry* **2007**, *103*, 88–93.

### 3. Résultats et discussions

---

16. Berthels, N.J.; Cordero Otero, R.R.; Bauer, F.F.; Thevelein, J.M.; Pretorius, I.S. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* **2004**, *4*, 683–689.
17. Boulton, R.B.; Singleton, V.L.; Bisson, L.F.; Kunkee, R.E. *Principles and practices of winemaking*; Chapman & Hall: New York, 1995; ISBN 978-1-4419-5190-8.
18. Fleet, G.H. Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research* **1990**, *1*, 211–223.
19. Riekstina-Dolge, R.; Kruma, Z.; Karklina, D.; Dimiņš, F. Physical-chemical parameters of Latvian apple juices and their suitability for cider production. *International Journal of Nutrition and Food Engineering* **2014**, *8*, 263–267.
20. Nour, V.; Trandafir, I.; Ionica, M.E. Compositional Characteristics of Fruits of several Apple (*Malus domestica* Borkh.) Cultivars. *I* **2010**, *38*, 228–233.
21. Campeanu, G.; Neata, G.; Darjanschi, G. Chemical composition of the fruits of several apple cultivars growth as biological crop. *I* **2009**, *37*, 161–164.
22. Valois, S.; Merwin, I.A.; Padilla-Zakour, O.I. Characterization of fermented cider apple cultivars grown in upstate New York. *Journal of the American Pomological Society* **2006**, *60*, 113–128.
23. Worobo, R.W.; Splittoesser, D.F. Microbiology of fruit products. In *Processing fruits*; Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H.S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2004.
24. Nogueira, A.; Guyot, S.; Marnet, N.; Lequéré, J.M.; Drilleau, J.-F.; Wosiacki, G. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2008**, *51*, 1025–1032.
25. Park, J. Characterizing and improving the oral sensations and preference of polyphenol-rich aronia berry juice. Honors Scholar Theses, University of Connecticut: Storrs, 2014.
26. Symoneaux, R.; Baron, A.; Marnet, N.; Bauduin, R.; Chollet, S. Impact of apple procyanidins on sensory perception in model cider (part 1): Polymerisation degree and concentration. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *57*, 22–27.
27. Mangas, J.J.; Rodríguez, R.; Suárez, B.; Picinelli, A.; Dapena, E. Study of the phenolic profile of cider apple cultivars at maturity by multivariate techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4046–4052.
28. Arshad, M.; Shahnawaz, M.; Shahkeela, S.; Hussain, M.; Ahmad, M.; Khan, S.S. Significance of physical properties of apple fruit influenced by preharvest orchard management factors. *European Journal of Experimental Biology* **2014**, *4*, 82–89.
29. Barnett, J.A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **2000**, *16*, 755–771.
30. Romano, P.; Suzzi, G.; Comi, G.; Zironi, R.; Maifreni, M. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **1997**, *82*, 615–618.

### 3. Résultats et discussions

---

31. de Arruda Moura Pietrowski, G.; dos Santos, C.M.E.; Sauer, E.; Wosiacki, G.; Nogueira, A. Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9815–9821.
32. Capozzi, V.; Berbegal, C.; Tufariello, M.; Grieco, F.; Spano, G.; Grieco, F. Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations. *LWT* **2019**, *109*, 241–249.
33. Lleixà, J.; Martín, V.; Portillo, M.D.C.; Carrau, F.; Beltran, G.; Mas, A. Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 338.
34. López, S.; Mateo, J.J.; Maicas, S. Screening of *Hanseniaspora* strains for the production of enzymes with potential interest for winemaking. *Fermentation* **2016**, *2*, 1.
35. Martin, V.; Valera, M.J.; Medina, K.; Boido, E.; Carrau, F. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines—A review. *Fermentation* **2018**, *4*, 76.
36. Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **2000**, *16*, 675–729.
37. Zohre, D.E.; Erten, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry* **2002**, *38*, 319–324.
38. Al Daccache, M.; Koubaa, M.; Salameh, D.; Maroun, R.G.; Louka, N.; Vorobiev, E. Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples. *Ultrasonics Sonochemistry* **2020**, *63*, 104952.
39. Al Daccache, M.; Koubaa, M.; Salameh, D.; Vorobiev, E.; Maroun, R.G.; Louka, N. Control of the sugar/ethanol conversion rate during moderate pulsed electric field-assisted fermentation of a *Hanseniaspora* sp. strain to produce low-alcohol cider. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2020**, *59*, 102258.
40. Firatlıgil-Durmuş, E.; Šárka, E.; Bubník, Z. Image vision technology for the characterisation of shape and geometrical properties of two varieties of lentil grown in turkey. *Czech Journal of Food Science* **2007**, *26*, 109–116.
41. Milošević, T.; Milošević, N.; Gliši, I.; Gliši, I.S. Determination of size and shape properties of apricots using multivariate analysis. *Acta Scientiarum Polonorum* **2014**, *13*, 77–90.
42. Mohsenin, N.N. *Physical properties of plant and animal materials: structure, physical characteristics, and mechanical properties*; Gordon and Breach: New York, 1986;
43. Jain, R.K.; Bal, S. Properties of pearl millet. *Journal of Agricultural Engineering Research* **1997**, *66*, 85–91.
44. Marquina, P.L.; Burgos, J.; Oria, R. Application of a compression-relaxation test for the characterization of burlat sweet cherry. *J. texture stud* **2001**, *32*, 15–30.

### 3. Résultats et discussions

---

45. Magwaza, L.S.; Opara, U.L. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products - A review. *Scientia Horticulturae* **2015**, *184*, 179–192.
46. Koubaa, M.; Mhemdi, H.; Vorobiev, E. Seed oil polyphenols: rapid and sensitive extraction method and high resolution-mass spectrometry identification. *Anal. Biochem.* **2015**, *476*, 91–93.
47. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995**, *28*, 25–30.
48. Al Daccache, M.; Salameh, D.; Maroun, R.; Louka, N. *New indigenous yeast strains "Hanseniaspora Meyeri-Libani" for the elaboration of cider*"; Patent number: 12017/10-11265L: Lebanon, 2017;
49. Pando Bedriñana, R.; Querol Simón, A.; Suárez Valles, B. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 503–508.
50. Valles, B.S.; Bedriñana, R.P.; Tascón, N.F.; Simón, A.Q.; Madrera, R.R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 25–31.
51. Ercisli, S.; Sayinci, B.; Kara, M.; Yildiz, C.; Ozturk, I. Determination of size and shape features of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using image processing. *Scientia Horticulturae* **2012**, *133*, 47–55.
52. Downes, J.W. Equipment for extraction and processing of soft and pome fruit juices. In *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages*; Ashurst, P.R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1995; pp. 197–220.
53. Wlodarska, K.; Pawlak-Lemanska, K.; Gorecki, T.; Sikorska, E. Perception of apple juice : A comparison of physicochemical measurements, descriptive analysis and consumer responses. **2016**, *39*, 351–361.
54. Riekstina-Dolge, R.; Kruma, Z.; Dimins, F.; Straumite, E.; Karklina, D. Phenolic composition and sensory properties of ciders produced from Latvian apples. *Rural Sustainability Research* **2014**, *31*, 39–45.
55. Harker, F.R.; Amos, R.L.; Echeverría, G.; Gunson, F.A. Influence of texture on taste: Insights gained during studies of hardness, juiciness, and sweetness of apple fruit. *Journal of Food Science* **2006**, *71*, S77–S82.
56. Bayarri, S.; Calvo, C.; Costell, E.; Durán, L. Influence of color on perception of sweetness and fruit flavor of fruit drinks. *Food sci. technol. int.* **2001**, *7*, 399–404.
57. Sanoner, P.; Guyot, S.; Marnet, N.; Molle, D.; Drilleau, J.P. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4847–4853.
58. Will, F.; Schulz, K.; Ludwig, M.; Otto, K.; Dietrich, H. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. *International Journal of Food Science & Technology* **2002**, *37*, 653–660.

### 3. Résultats et discussions

---

59. Gliszczynska-Swiglo, A.; Tyrakowska, B. Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the teac antioxidant activity. *Journal of Food Science* **2003**, *68*, 1844–1849.
60. Bradshaw, T.L.; Kingsley-Richards, S.L.; Foster, J. Apple cultivar evaluations for cider making in Vermont, USA. *Acta Horticulturae* **2018**, 453–460.
61. Jarvis, B. The product and its manufacture - Chemistry and microbiology of cidermaking. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Oxford, 2003; pp. 1312–1318 ISBN 978-0-12-227055-0.
62. Merwin, I.A.; Valois, S.; Padilla-Zakour, O.I. Cider apples and cider-making techniques in Europe and north America. In *Horticultural reviews*; Janick, J., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2008; pp. 365–415 ISBN 978-0-470-38014-7.
63. Lachenmeier, D.W.; Gill, J.S.; Chick, J.; Rehm, J. The total margin of exposure of ethanol and acetaldehyde for heavy drinkers consuming cider or vodka. *Food and Chemical Toxicology* **2015**, *83*, 210–214.
64. Wei, J.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Ju, H.; Niu, C.; Song, Z.; Yuan, Y.; Yue, T. Assessment of chemical composition and sensorial properties of ciders fermented with different non-*Saccharomyces* yeasts in pure and mixed fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **2020**, *318*, 108471.
65. Thierie, J.; Penninckx, M. Crabtree effect. In *Encyclopedia of industrial biotechnology*; Flickinger, M.C., Ed.; American Cancer Society, 2010; pp. 1–18 ISBN 978-0-470-05458-1.



#### 3.2. Etude de l'impact des technologies émergentes (CEP & US) sur les cinétiques fermentaires.

Le traitement physique des microorganismes avec de faibles intensités de CEP a fait l'objet de nombreuses études évaluant son pouvoir stimulant sur l'activité microbienne. Les nombreux résultats obtenus, tantôt se rejoignent et tantôt se contredisent, indiquent que ces traitements auront un effet sur l'activité fermentaire des microorganismes, affectant alors le déroulement de la fermentation. Dans ce contexte, nous nous intéressons à l'étude de l'impact des CEP et des US sur la levure *Hanseniaspora* sp. au cours de la fermentation du jus de pommes.

A la lumière des études déjà mentionnées dans le premier chapitre, nous pouvons remarquer que l'intérêt de ces études portent uniquement sur les conséquences du traitement sur la fermentation et non sur son impact sur la levure. De ce fait, durant nos études, nous ne nous limiterons pas uniquement aux changements observés à la fin des fermentations sous traitement, mais au suivi des cinétiques de croissances microbiennes, de production d'éthanol, et de consommation de substrats tout au long des fermentations. Nous pourrions, en conséquence, calculer les différents indicateurs de performance de la levure essayant ainsi de mieux comprendre son comportement au cours des fermentations effectuées sous traitement par rapport à celles non-traitées.

Ainsi, nous présenterons dans cette partie deux études : l'une exposant l'impact des CEP sur la fermentation du jus de pommes, et la deuxième l'effet des US.

##### 3.2.1. Evaluation de l'impact des CEP sur la levure *Hanseniaspora* sp. au cours de la fermentation du jus de pommes libanaises en vue de l'élaboration du cidre.

Avant de se pencher sur l'étude de l'impact des CEP sur la fermentation du jus de pommes, nécessitant une durée relativement longue (100 h de suivi), nous avons cherché à tester les conditions de traitements à savoir : la géométrie de la cellule de traitement, le débit de circulation dans la cellule, et l'intensité de traitement dans un milieu de culture synthétique, où les cinétiques fermentaires sont plus rapides. Une fois l'effet des CEP sur la levure est étudié lors de sa croissance dans un milieu synthétique, et les paramètres de traitement optimaux sont bien définis, nous adapterons ces paramètres sur la fermentation du jus de pommes.

###### 3.2.1.1. Fermentation assistée par CEP de la levure *Hanseniaspora* sp. isolée à partir des pommes libanaises

Cette étude avait pour but de déterminer les paramètres optimaux pour le traitement de la levure par CEP. Un premier objectif était de concevoir une chambre capable d'assurer le traitement par CEP en continu. Le second objectif était d'étudier l'effet de diverses intensités de traitement pour déterminer les conditions de traitements ayant un effet stimulant sur les levures.

###### 3.2.1.1.1. Résumé de l'article

Durant cette étude, la levure *Hanseniaspora* sp. a été stimulée par CEP au cours des différentes phases de fermentation. D'abord, une chambre de traitement en continu a été conçue. Une bague en téflon en forme de disque a été placée entre deux électrodes parallèles en acier inoxydable. En conséquence, un canal assurant le flux de liquide sera formé avec une

### 3. Résultats et discussions

---

distance entre les électrodes de 1,4 cm. Deux raccords de tuyauterie ont été ajoutés pour le fonctionnement de la cellule en continue. Une pompe péristaltique permettait la circulation du fluide du réacteur à la chambre de traitement et son retour dans le réacteur.

D'abord des fermentations contrôles ont été conduites. Des fermentations en batch ont été suivies et prises comme référence pour choisir un débit de circulation n'affectant pas les cinétiques fermentaires. Différents débits de circulation ont été testés (25, 50, et 75 mL/min) sans application des CEP. Un débit de 75 mL/min a permis d'obtenir la même cinétique de croissance et de consommation de glucose obtenue en mode discontinu sans circulation. Les fermentations sans traitement par CEP, mais avec circulation dans la chambre de traitement, avec un débit de 75 mL/min seront considérées comme fermentations contrôles pour notre étude.

L'impact des paramètres de CEP entre 72 et 285 V/cm sur le taux de croissance et la consommation de substrat a été étudié. L'impact le plus important des CEP sur le taux de croissance de la levure a été obtenu pour une intensité de champ électrique de 285 V/cm et un traitement de 6 h durant les phases de latence et exponentielle. La stimulation des levures est accompagnée par une consommation plus rapide de glucose dans le milieu pendant la fermentation. De plus, le taux de croissance spécifique  $\mu_{\max}$  le plus élevé ( $0,47 \text{ h}^{-1}$ ) a été observé pour la fermentation assistée par CEP à 285 V/cm.

Par ailleurs, l'étude montre que la sensibilité de *Hanseniaspora sp.* au traitement par CEP était plus prononcée durant la phase de latence que durant la phase exponentielle.

De plus, l'impact des CEP sur la taille de la levure a été étudié. Une observation des cellules au microscope électronique à balayage (MEB) a montré une légère augmentation de la taille des cellules après le traitement par CEP. Les photos MEB ont montré également que le traitement n'induit pas de déformations irréversibles des levures et les cellules conservent leur forme après le traitement.

Les résultats obtenus dans cette étude ont mis en évidence le potentiel de la mise en œuvre pratique de la technologie de fermentation assistée par CEP pour améliorer les performances de la levure. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de la stimulation microbienne par les CEP.

#### **3.2.1.1.2. Article: Pulsed electric field-assisted fermentation of *Hanseniaspora sp.* yeast isolated from Lebanese apples.**

*(Voir le manuscrit qui suit)*



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)

## Pulsed electric field-assisted fermentation of *Hanseniaspora* sp. yeast isolated from Lebanese apples



Marina Al Daccache<sup>a,b</sup>, Mohamed Koubaa<sup>c,\*</sup>, Richard G. Maroun<sup>b</sup>, Dominique Salameh<sup>b</sup>,  
Nicolas Louka<sup>b</sup>, Eugène Vorobiev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA 4297 TIMR, Centre de recherche Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne Cedex, France

<sup>b</sup> Faculté des Sciences, Centre d'Analyses et de Recherche, UR TVA, Laboratoire CTA, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon

<sup>c</sup> ESCOM, UTC, EA 4297 TIMR, 1 allée du réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Hanseniaspora* sp.  
Fermentation  
Stimulation  
Pulsed electric field

### ABSTRACT

*Hanseniaspora* sp. yeast was stimulated using pulsed electric field (PEF) during the different fermentation phases. The impact of PEF parameters on the growth rate and substrate consumption was studied. The PEF intensities chosen for this study were mainly in the range of 72–285 V cm<sup>-1</sup>. A PEF treatment chamber was designed for this study with a ratio of 1:50 between the volume of the fermenter and the volume of the chamber. It allows the recycling of the culture medium using a peristaltic pump, and the yeast treatment by PEF during the fermentation. The continuous circulation of the medium allows avoiding the increase of the temperature inside the fermenter, the cell aggregation, as well as the agitation and the scale-up issues that are associated with the PEF treatment of the entire volume in batch mode. The maximal yeast growth rate was obtained using an electric field strength of 285 V cm<sup>-1</sup> applied during both Lag and early exponential phase, and Log phase. This observation was accompanied by a faster consumption of glucose in the medium during the fermentation. Besides, the sensitivity of *Hanseniaspora* sp. yeast to PEF treatment was more pronounced during the Lag and early exponential phase than the Log phase. The results obtained exposed the great benefit of stimulating *Hanseniaspora* sp. yeast using moderate PEF as it reduces the fermentation time along with increasing the biomass concentration.

### 1. Introduction

The responses of living organisms under electric field have been attracting great attention for several decades (Berg, 1995; Hart & Palisano, 2017). These responses include changes in the synthesis of DNA and proteins, cell growth, electroporation of the cell membranes, biochemical reactions, electrofusion of cells, and the inactivation or stimulation of microorganisms (Góral & Pankiewicz, 2017; Liu, Lebovka, & Vorobiev, 2013; Martínez, Cebrián, Álvarez, & Raso, 2016; Martínez, Delso, Maza, Álvarez, & Raso, 2019; Teissié et al., 2002). These effects depend on different factors, including the cell type and size, the application time, and the intensity of the electric field. However, the mechanisms behind these changes are complex and not yet fully understood. Nonetheless, multiple industrial applications have been developed specifically for the inactivation of microorganisms (Barba, Koubaa, do Prado-Silva, Orlie, & de Souza Sant'Ana, 2017; El Zakhem, Lanoisellé, Lebovka, Nonus, & Vorobiev, 2006; González-Arenzana et al., 2018; Montanari et al., 2019). This involves the use of

high electric field intensity, where the irreversible cell membrane electroporation has been mainly attributed to the inactivation mechanism.

When applying low electric field intensities, considered at sub-lethal levels, the microorganisms are stimulated rather than inactivated (El Zakhem et al., 2006; Mattar et al., 2014, 2015; Mota et al., 2018; Wang et al., 2018). The first study describing the stimulation of microorganisms in presence of electric field was performed by Heinz Doeve in 1962 (cited by Sitzmann (2016)), who reported that the cultures of *Escherichia coli* being treated with field strengths below 3 kV cm<sup>-1</sup> seemed to increase their growth rates. This impact of electrostimulation has been patented a few years later (Doeve, 1966). Since that, several examples have been described in the literature concerning the stimulation of microorganisms by PEF (Ohba, Uemura, & Nabetani, 2016; Yeo & Liang, 2013; Yeo, Ong, & Liang, 2014). Through these works, several observations such as the acceleration of fermentation, better production of the metabolites of interest, and a larger number of cells have been reported compared to the non-

\* Corresponding author.

E-mail address: [m.koubaa@escom.fr](mailto:m.koubaa@escom.fr) (M. Koubaa).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108840>

Received 26 August 2019; Received in revised form 12 November 2019; Accepted 18 November 2019

Available online 29 November 2019

0963-9969/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 3. Résultats et discussions

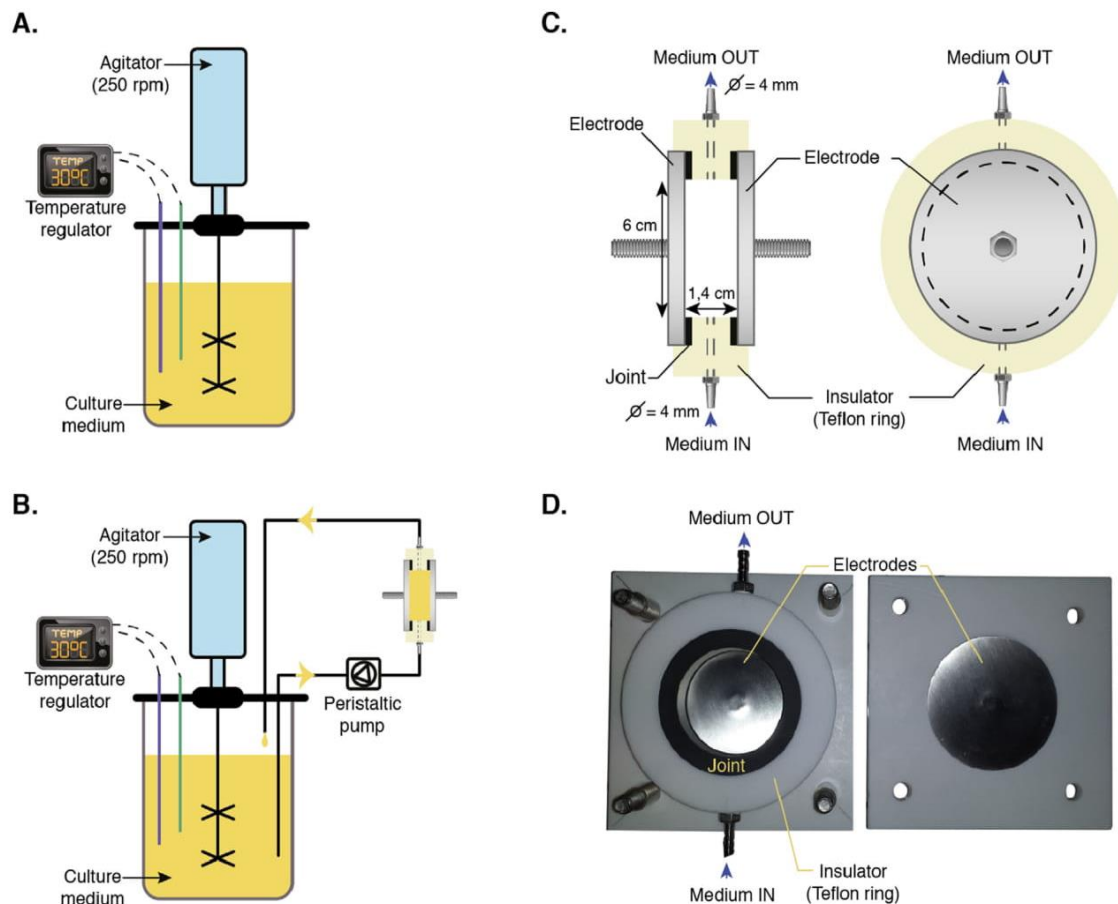


Fig. 1. A. Control batch mode fermentation without medium circulation, B. Control batch mode fermentation with medium circulation (without PEF treatment), C. Schematic diagram of the designed PEF-treatment chamber designed specifically for the current study, D. Real photo of the PEF-treatment chamber.

stimulated controls. For instance, the stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* yeast by PEF was successfully carried out in batch mode (Mattar et al., 2014, 2015). In these works, pulses of  $20\text{--}2000\text{ V cm}^{-1}$  for  $10^{-5}\text{--}1\text{ s}$  (Mattar et al., 2014), and 100 and  $6000\text{ V cm}^{-1}$  for  $100\text{ }\mu\text{s}$  (Mattar et al., 2015) were applied. The stimulation increased in the fermentation rate, mainly in the initial fermentation phase (adaptation phase). Therefore, the results indicate a great potential for the practical implementation of PEF-assisted fermentation technology to improve yeast performances. However, the mechanisms remain yet unclear. There are two possible mechanisms for improved yeast performance by PEF that have been described in the literature, the first one being related to the expression of oxidative stress response genes during PEF treatment (Tanino, Sato, Oshige, & Ohshima, 2012), and the second is related to the changes in the activity of certain membrane proteins allowing the assimilation of a larger amount of substrates (Vassu et al., 2004).

Regarding the great potential behind implementing PEF technology in the fermentation processes, more investigations are required in this field to further study the impact of low-intensity PEF treatments on microorganisms during the fermentation process and not only prior to it. Most of the studies, above-mentioned, were focused on applying a PEF treatment shortly before the inoculation, and not during the fermentation process itself. This work aimed to evaluate the impact of PEF treatment during the fermentation process and by growth phase. Treating the culture medium in batch mode directly in the fermenter is associated with many issues including the increase of temperature inside the fermenter, the difficulty of agitation, the cell aggregation, as well as the scaling-up issues. Furthermore, studying the impact of PEF during the growth phases is crucial for a better understanding of the

microbial stimulation mechanisms. In this line, this paper aimed to study the impact of the continuous PEF treatment on the growth of the non-*Saccharomyces* yeast *Hanseniaspora* sp. The growth and glucose consumption kinetics were recorded during the fermentation processes, depending on the electric field strengths and the growth phases. In fact, the genus *Hanseniaspora* was identified during spontaneous fermentation of apple juice (Pando Bedriñana, Querol Simón, & Suárez Valles, 2010; Valles, Bedriñana, Tascón, Simón, & Madrera, 2007), and its positive effects in alcoholic fermentation and cider production has been exposed (Capozzi et al., 2019). It has been reported that the use of this strain may contribute to a better aroma profile of the fermented apple juice (de Arruda Moura Pietrowski, dos Santos, Sauer, Wosiacki, & Nogueira, 2012).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast growth

*Hanseniaspora* sp. yeast strain used in this work is belonging to the authors' laboratory strains collection (Al Daccache, Salameh, Maroun, & Louka, 2017). It was previously isolated and identified from spontaneous fermentation of a Lebanese apple juice obtained from the variety "Ace Spur". A Yeast-Extract- Peptone- Dextrose (YPD) medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) was used for the culture of *Hanseniaspora* sp. yeast cells.



## 2.2. Fermentation processes

### 2.2.1. *Hanseniaspora sp.* pre-culture

The pre-cultures for the different fermentations (i.e. control and PEF-assisted) were performed by taking one colony of the yeast strain from a YPD agar plate (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, and 2% agar) into 250 mL YPD liquid medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose), under sterile conditions (20 min at 121 °C in an autoclave HMC HV-110L (HMC Europe GmbH, Germany)). The incubation was performed during 24 h, at 30 °C temperature, and 250 rpm agitation speed in a shaker (Thermo Scientific, France), which allows the yeast to reach the late exponential phase.

### 2.2.2. Control fermentations

A volume of 1.5 L of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) was introduced into a 2-L fermenter (LSL Biolafitte S.A.). After sterilization as above-mentioned and cooling to 30 °C, the medium was inoculated by the pre-culture to get an initial concentration of  $4.5 \cdot 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, corresponding to an initial OD of 0.1. The control fermentation in batch mode without medium circulation (Fig. 1A) was performed at 250 rpm agitation speed, and temperature maintained at 30 °C. After recording the kinetics of growth and glucose consumption in batch mode without medium circulation, a treatment chamber was designed to allow the circulation of the medium and the yeast treatment by PEF during the fermentation (Fig. 1B). The medium circulation is required since the treatment for a long time during the fermentation may induce the cell aggregation (El Zakhem et al., 2006), and an undesirable increase in the medium temperature (Morales-de la Peña, Elez-Martínez, & Martín-Belloso, 2011). For this purpose, two parallel stainless steel electrodes (3 mm width, 6 cm diameter) were used and fixed between two insulators (Fig. 1C and D). A disk-shaped Teflon ring was placed between the electrodes, forming a channel for the streaming liquid and providing a distance between the electrodes of 1.4 cm. The volume of the treatment chamber was thereby around 40 mL (a ratio of 1:50 between the volume of the fermenter and the volume of the chamber). Two pipe fitting connectors were added to make it operate as a continuous chamber. A peristaltic pump allowed the medium circulation from the reactor to the treatment chamber and back into the reactor. Different circulation flow rates were tested (25, 50, and 75 mL min<sup>-1</sup>) without PEF application, to get the same growth and glucose consumption kinetics obtained in batch mode without circulation (Fig. 1A). The total length of the tubes used was equal to 90 cm. The treatment chamber and the tubes were sterilized as above-mentioned.

### 2.2.3. PEF-assisted fermentations

The designed PEF-treatment chamber was used for the electro-stimulation of *Hanseniaspora sp.* yeast. For this purpose, the two

electrodes were connected to a PEF generator made by the “Service électronique” of the University of Technology of Compiègne (France) (Fig. 2A). It provided bipolar pulses of nearly rectangular shape, with the respective maximal delivered voltage and current of 400 V and 40 A. Three PEF-assisted fermentations were investigated: (1) PEF-treatment for 6 h during the Lag and Log phases, (2) PEF-treatment for 3 h during the Lag (adaptation) and early exponential phase, and (3) PEF-treatment for 3 h during the Log (exponential) phase. The PEF treatments consisted of applying a succession of trains, each composed of  $n = 10$  pulses during the Lag and Log fermentation phases. Each pulse duration was fixed to  $t_i = 100 \mu\text{s}$ , with a pulse period time of  $\Delta t = 1 \text{ ms}$ . The time between the trains was fixed to  $\Delta t = 1 \text{ s}$  (Fig. 2B). When treating the culture medium during the Lag and Log phases corresponding both to 6 h, the number of trains  $N$  applied was 10 716, which corresponded to an effective electric field treatment  $t_{PEF}$  of 10.716 s ( $t_{PEF} \text{ (s)} = N \cdot n \cdot t_i \text{ (s)}$ ). Different electric field strengths  $E$  were tested in the range of 72–285 V cm<sup>-1</sup> (Fig. 2). For instance, when applying the maximal voltage of 400 V delivered by PEF equipment and taking into account the distance of 1.4 cm between the electrodes, this corresponded to applying 285 V cm<sup>-1</sup> field intensity. All the output data (e.g., current  $I$  (A) and voltage  $U$  (V)) were recorded using a data logger and software developed by the “Service électronique” of the University of Technology of Compiègne (France). The specific power consumption of PEF treatment  $W$  (J mL<sup>-1</sup>) was calculated according to Eq. (1):

$$W \text{ (JmL}^{-1}\text{)} = \frac{U \cdot I \cdot t_{PEF}}{V} \quad (1)$$

where  $U$  is the voltage (V),  $I$  is the current intensity (A),  $t_{PEF}$  is the time of the PEF treatment,  $t_{PEF} = N \cdot n \cdot t_i$ ,  $N$  is the number of trains,  $n$  is the number of pulses per train, and  $V$  is the volume of the culture medium in the bioreactor (mL).

## 2.3. Determination of growth and glucose consumption kinetics

The kinetics of growth and glucose consumption were recorded during the batch fermentation modes with and without culture medium circulation, and during the PEF-assisted fermentations.

### 2.3.1. Determination of the growth kinetics

The growth kinetics were followed by both (1) measuring the optical density (OD) at 600 nm, and (2) determining the cell concentration (cells mL<sup>-1</sup>). Samples were taken periodically during the fermentation processes, and their OD values were determined using a Thermo Spectronic BioMate 3 UV-visible spectrophotometer (Thermo Scientific, France). For cell counting, serial dilutions were made for each sample, and the cells were counted using a Thoma cell counting chamber (Preciss, France). To detect the viable cells, the samples were

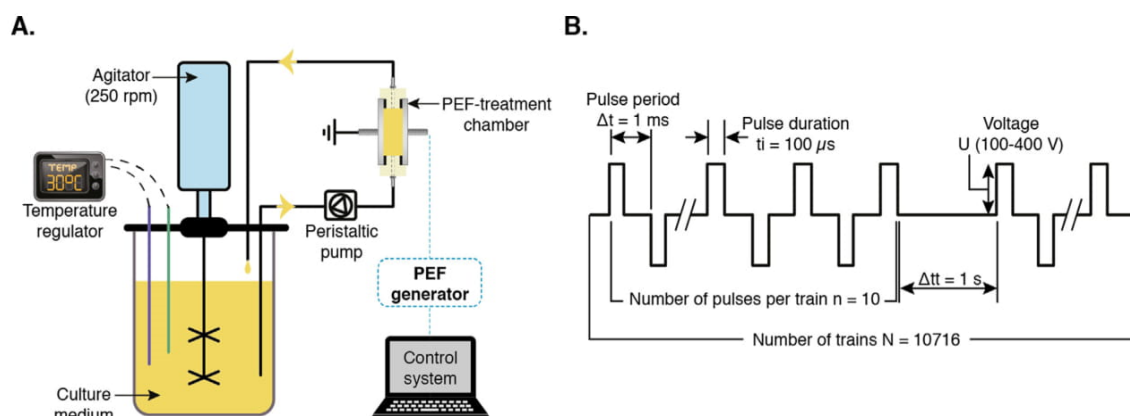


Fig. 2. A. A schematic representation of the PEF-assisted fermentation processes. B. PEF-treatment parameters applied for *Hanseniaspora sp.* yeast stimulation.

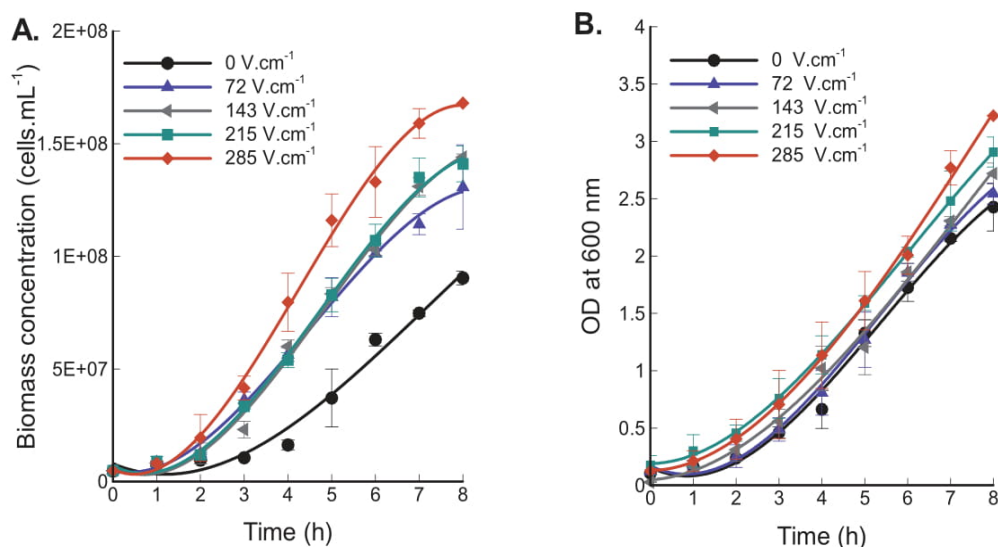


Fig. 3. A. Growth kinetics (viable cells) for the control and the PEF-assisted fermentations. B. Optical densities at 600 nm for the control and the PEF-assisted fermentation processes treated during the first 6 h and conducted until 8 h of fermentation. Each fermentation experiment was repeated three times; the error bars correspond to the standard deviations of each measurement.

mixed volume to volume with a solution of 0.01% methylene blue. The biomass concentration  $X$  (cells  $\text{mL}^{-1}$ ) and biomass yield  $Y_{X/S}$  ( $\text{g}_{\text{biomass}} \text{g}_{\text{substrate}}^{-1}$ ) were calculated respectively according to Eqs. (2) and (3),

$$X (\text{cells mL}^{-1}) = \frac{a \cdot 250000 \cdot d}{b} \quad (2)$$

where  $a$  is the number of cells counted,  $d$  is the dilution factor,  $b$  is the number of squares counted in the chamber, and 250000 corresponds to a constant included in the formula of the Thoma cell.

$$Y_{X/S} (\text{g}_{\text{biomass}} \text{g}_{\text{substrate}}^{-1}) = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3)$$

where  $X_0$  and  $X_f$  are respectively the initial and the final biomass concentrations ( $\text{g L}^{-1}$ ), and  $S_0$  and  $S_f$  represent respectively the initial and the final glucose concentrations ( $\text{g L}^{-1}$ ).

The maximal specific growth rate  $\mu_{\text{max}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) was determined by plotting  $\ln X$  (cells  $\text{mL}^{-1}$ ) versus time (h).  $\mu_{\text{max}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) values correspond to the slopes of the curves obtained during the exponential phases.

### 2.3.2. Determination of the glucose consumption kinetics

The content of soluble compounds was followed by measuring the °Brix using a digital refractometer (Anggur DR401, France). The concentrations of glucose were determined using high-performance liquid chromatography instrument LC-20AD (Shimadzu, Japan). The samples taken during the fermentation processes (used for the determination of the growth kinetics) were diluted 10 times in ultrapure water, and 1  $\mu\text{L}$  was injected. The separation was performed in isocratic mode (a mixture of 1:4 (20:80, v:v) water/acetonitrile with a flow rate of 3  $\text{mL min}^{-1}$ ), and using a Luna 5  $\mu\text{m NH}_2$  ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ) column. The separation temperature was set to 40 °C, and the molecules were detected using a low-temperature evaporative light scattering detector ELSD-LT II (Shimadzu, Japan). The compounds' assignment and quantification were performed using pre-established standard curves of glucose (5–30  $\text{g L}^{-1}$ ).

The glucose consumption rate was calculated according to Eq. (4).

$$\frac{dS}{dt} (\text{g}_{\text{glucose}} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{S_0 - S_f}{t_f - t_0} \quad (4)$$

where  $S_0$  and  $S_f$  are respectively the initial and the final substrate concentrations ( $\text{g L}^{-1}$ ), whereas  $t_0$  and  $t_f$  are respectively the initial and the final times.

### 2.4. Scanning electron microscopy

The impact of PEF on *Hanseniaspora* sp. yeasts was followed using an ESEM Quanta FEG 250 Scanning Electron Microscope (Philips, USA). The pictures were taken after 6 h fermentation, for the untreated and the PEF-treated culture at 285  $\text{V cm}^{-1}$ , respectively. The samples (1 mL) taken from the fermenter were immediately centrifuged at 13,000g for 2 min, and the yeast pellet was washed twice with 1 mL physiologic water and centrifuged under the same conditions to remove the medium traces. Each sample was then resuspended in physiologic water, and  $\approx 20 \mu\text{L}$  were placed on the analysis plate of the microscope. A vacuum-drying step was then performed at 5 °C and 800 Pa ( $\approx 6 \text{ Torr}$ ), and the samples were analyzed by electron beam at 20 kV. All pictures were taken at the physicochemical analysis service of the University of Technology of Compiègne (France).

### 2.5. Statistical analyses

Each fermentation experiment was repeated three times. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for the statistical analysis of the data with the help of Statgraphics Plus software (version 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). The significance level at 95% confidence was taken for each analysis. The values presented in the figures correspond to the mean value of the repetition, and the error bars correspond to the standard deviations of each measurement.

## 3. Results and discussion

A medium circulation flow rate of 75  $\text{mL min}^{-1}$  allowed obtaining the same growth kinetic compared to the control fermentation without circulation. It was thereby used for PEF-assisted fermentations. First, PEF was applied between the electrodes of the treatment chamber during the Lag (adaptation) and the Log (exponential) phases, corresponding together to 6 h treatment, and an effective PEF application time of 10.716 s. The results obtained and presented in Fig. 3 show an increase in the yeast concentrations in the fermenter, proportionally to the PEF intensity, compared to the untreated suspension. Applying PEF intensities of 72, 143, and 215  $\text{V cm}^{-1}$  seems to induce a nearly similar stimulation effect on yeasts, with no significant differences between the three growth kinetics. The stimulation effect was more pronounced when an intensity of 285  $\text{V cm}^{-1}$  was applied (Fig. 3A). In fact, it has



### 3. Résultats et discussions

**Table 1**

Energy consumptions, and fermentation process performances ( $Y$  (g biomass/ g glucose),  $dS/dt$ ,  $\mu_{max}$ ) during PEF treatments.

	Lag and Log phases treatments					Lag and early exponential phase treated		Log phase treated alone 285 V cm <sup>-1</sup>
	0 V cm <sup>-1</sup>	72 V cm <sup>-1</sup>	143 V cm <sup>-1</sup>	215 V cm <sup>-1</sup>	285 V cm <sup>-1</sup>	285 V cm <sup>-1</sup>		
W (J mL <sup>-1</sup> )	N.A.	5.0 ± 0.4	22.0 ± 0.8	44.0 ± 1.03	82.0 ± 1.4	41.0 ± 0.9	42.0 ± 0.5	
Y (g biomass/ g glucose)	0.075 ± 0.003	0.090* ± 0.002	0.090* ± 0.005	0.090* ± 0.003	0.100* ± 0.001	0.110* ± 0.001	0.090* ± 0.007	
dS/dt (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1.43 ± 0.02	1.56 ± 0.12	1.74* ± 0.02	1.74* ± 0.03	1.98* ± 0.01	1.66* ± 0.06	1.54 ± 0.08	
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.39 ± 0.004	0.42 ± 0.01	0.43* ± 0.005	0.43* ± 0.008	0.47* ± 0.01	0.45* ± 0.004	0.41 ± 0.003	

The \* denotes significant differences, N.A. denotes non-applicable.

been previously reported that the electrostimulation is energy (J mL<sup>-1</sup>) dependent, and it is not directly related to the intensity of the electric field E applied (Mattar et al., 2014). Treating the cell suspension at 285 V cm<sup>-1</sup> leads to a significant increase in the final biomass concentration by 75%, corresponding to an increase in the number of cells from 9.0\*10<sup>7</sup> (for the control experiment) to 1.6\*10<sup>8</sup> cells mL<sup>-1</sup>. These results were supported by the measurements of the optical densities (OD values at 600 nm), which demonstrated a significant increase (from 2.43 for the control experiment to 3.23 for the PEF-assisted fermentation) at 285 V cm<sup>-1</sup>, and after 8 h of fermentation (Fig. 3.B). Besides, the highest specific growth rate  $\mu_{max}$  (0.47 h<sup>-1</sup>) was observed for the PEF-assisted fermentation at 285 V cm<sup>-1</sup> (Table 1), which indicates a faster division of cells, involving a faster cell growth.

Applying 285 V cm<sup>-1</sup> field intensity to the cell suspension allowed a significant shortening of the Lag phase by around 1 h, compared to the untreated suspension (Lag phase ≈ 1.5 h). This behavior was previously observed by Castro, Oliveira, Domingues, Teixeira, and Vicente (2005), who reported similar results when treating a recombinant *S. cerevisiae* yeast (NCYC869-A3/pVK1.1) at low electric field intensities. Their results showed a greater biomass concentration of almost 3 times compared to the control, and a shorter Lag phase for the treated suspensions. Similarly, *S. cerevisiae* yeasts were stimulated during the grape fermentation when treated with PEF, showing an increase in biomass growth and sugar depletion (Mattar, Turk, Nonus, Lebovka, Zakhem, & Henri Vorobiev, 2013). In another study, the influence of static magnetic fields on *S. cerevisiae* yeast has been demonstrated, showing that the rate of the biomass growth in the samples of the magnetized cultures was 3.7 times higher than that of the control cultures (Muniz, Marcelino, Motta, Schuler, & Motta, 2007). A 100% increase in *S. cerevisiae* growth was also shown under pulses of 0.85 kV cm<sup>-1</sup> (Foloegea, Vassu-Dimov, Stoica, Csutak, & Radu, 1998). A possible explanation of these observations could be an increase in the yeast cells' division during the PEF treatment, which leads to a higher biomass concentration. In fact, it was reported that the use of PEF could induce some DNA damages, which affects the mitosis checkpoints and the cell cycle phase distribution, compared to the non-treated cells (Stacey et al., 2003). Kerns, Bauer, and Berg (1993) showed that the PEF-induced membrane permeability caused the growth stimulation of *Trichoderma reesei* at 1.5 mV cm<sup>-1</sup> pulses.

The results of the growth kinetics were supported by the quantification of glucose consumption during the fermentations. Fig. 4 presents both the evolution of °Brix and the glucose concentrations (determined by HPLC) for the PEF-assisted fermentations, compared to the control. The results show that the °Brix values concur with that of the glucose concentrations. Both values decreased faster for the PEF-treated samples, compared to the control fermentation, with the fastest glucose depletion obtained for the PEF-treatment applied at 285 V cm<sup>-1</sup>. After 8 h of fermentation, the °Brix decreased from 5.9% (g.100 mL<sup>-1</sup>) for the control to 5.1% (g.100 mL<sup>-1</sup>) for the PEF-assisted fermentation. Thus, for the PEF-treated suspensions, the glucose consumption rates were significantly higher than those of the control fermentation (Table 1). This could be explained by the greater yeast concentration, which induces higher glucose consumption, especially during the Log phase where the cells are exponentially duplicating. The results concur

with those of McCabe, Barron, McHale, and McHale (1995), who reported 40% increase in the cellobiose conversion for *Kluyveromyces marxianus* cells under pulses of 0.25 kV for 10 ms. Also, the absorption of nutrients could be enhanced after PEF-treatment by the improvement of the transport through the cell membrane. This could be mainly attributed to the pore formation and/or the activation of membrane proteins (Castro et al., 2005). The biomass yield on glucose was significantly higher for the treated samples after 8 h of fermentation (Table 1), which confirms the above-mentioned statements.

Aforementioned, the impact of PEF on the yeast size was studied. Fig. 5 shows a significant (p < 0.05) size increase of the cells after PEF treatment (5.6 ± 0.4 μm), compared to the untreated cells (4.1 ± 0.2 μm). This observation concurs with the significant increase in the biomass yield (Y (g<sub>biomass</sub> g<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>)) where the mass of biomass per gram increases for one gram of glucose consumed (0.1 g<sub>biomass</sub> g<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) for the samples treated by PEF at 285 V cm<sup>-1</sup> compared to the untreated ones (0.075 g<sub>biomass</sub> g<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>) (Table 1). The different calculations show an increase by 85% in the amount of biomass in gram compared to 75% increase in the number of cells per mL, which indicates a 10% increase in the cell volume after PEF treatment at 285 V cm<sup>-1</sup>. It could be also noted that the treatment did not induce irreversible deformations of the yeasts. The SEM photos show also that the cells kept their general shape after the treatment. The review of the literature shows that smaller cell size was observed for PEF-treated *S. cerevisiae* compared to the untreated ones (Araújo, Coelho, Margarit, Vaz-junior, & Rocha-Leão, 2004). This observation was not observed for the strain *Hanseniaspora* sp., studied here.

An important factor influencing the microorganisms' stimulation by PEF is the growth phase. It has been previously demonstrated that PEF has different impacts on microorganisms, depending on the growth phase (McDonald, Lloyd, Vitale, Petersson, & Innings, 2000). In this line, the impact of PEF (285 V cm<sup>-1</sup>) on the growth and glucose consumption kinetics was studied during each Lag and Log phases of the growth of *Hanseniaspora* sp. yeast. When the suspensions were treated during the first 3 h (Lag and early exponential phase), an increase in the yeast biomass concentration was observed. In fact, after 8 h fermentation, the biomass concentration was increased by 60% for the PEF-treated suspensions during this phase (Fig. 6). Lower yeast stimulation impact (25%) was observed for the suspensions treated only during the Log phase. Besides, faster sugar depletion was observed during the Lag phase, compared to the Log phase (Fig. 6), with a significant difference in the glucose consumption rates (Table 1). Even though, the sugar consumption rates were significantly higher than the control for both PEF-treatment suspensions.

The results obtained show that *Hanseniaspora* sp. yeast cells were sensitive to the PEF treatment during both Lag and Log phases, with more sensitivity during the Lag and early exponential phase. These results concur with those reported by Mattar et al., (2013) who observed a noticeable enhancement of the fermentation kinetics when stimulating *S. cerevisiae* cells by PEF, with a significant acceleration of the sugar consumption during the Lag phase. In addition, it was noted that the electroporation was more effective when the PEF was applied during the first hours of fermentation rather than that after 24 h. It seems that the cells became more resistant to electroporation for longer



### 3. Résultats et discussions

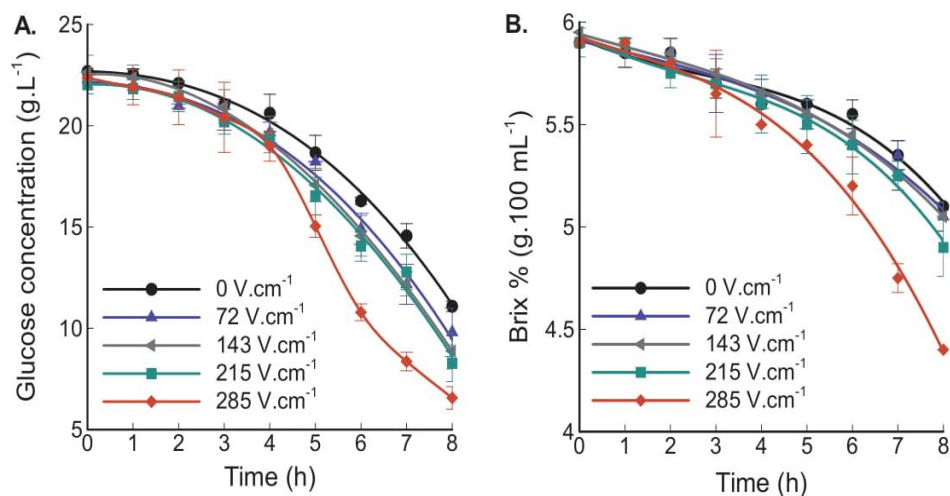


Fig. 4. A. Glucose consumption kinetics for the control and the PEF-assisted fermentations. B. Soluble compounds depletion kinetics for the control and the PEF-assisted fermentations. Each fermentation experiment was repeated three times; the error bars correspond to the standard deviations of each measurement.

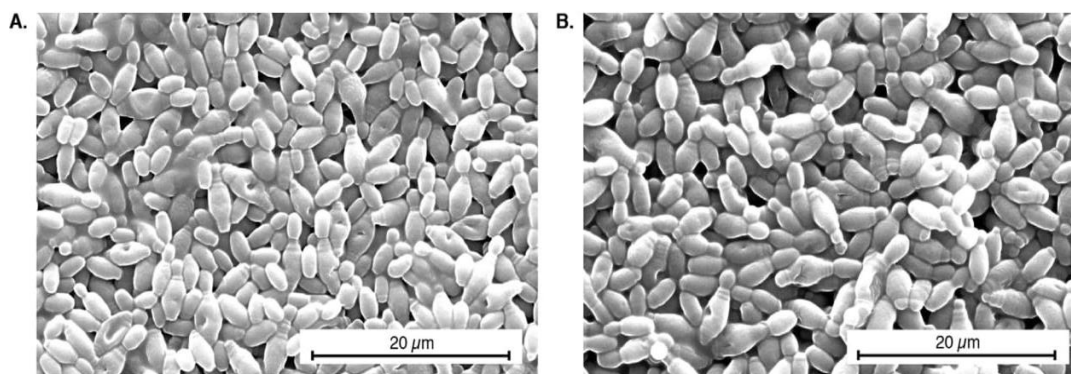


Fig. 5. Scanning electron microscopy pictures of *Hanseniaspora* sp. yeast after 6 h fermentation. A. Without PEF treatment, B. With PEF treatment at 285 V cm<sup>-1</sup> field intensity.

preliminary fermentation.

Regarding the energy consumption, it was obvious that the treatment at 285 V cm<sup>-1</sup> for 6 h consumed the highest energy, compared to the control and the other PEF-assisted fermentations (Table 1). However, it provided the fastest cell growth and glucose consumption kinetics. Overall, the results obtained in this work demonstrated the great benefit of stimulating *Hanseniaspora* sp. yeast by PEF as it involves reducing the fermentation time along with increasing the biomass concentration, and the low consumption of energy.

#### 4. Conclusion

In this work, the effects of PEF electrostimulation on *Hanseniaspora* sp. yeast cells were studied. For an effective treatment time of 10.716 s, applied during both the Lag and Log phases (6 h), the yeast concentration and the biomass yield increased significantly. The depletion of nutrients was also significantly faster. The yeast cells were more sensitive to PEF treatment during the Lag and early exponential phase rather than during the Log phase. The yeast concentration and the biomass yield increased significantly during the Lag and early exponential phase. However, the highest stimulation impact was observed using 285 V cm<sup>-1</sup> electric field intensity applied during both phases. Increased growth rates were accompanied by a faster depletion of glucose. The results obtained in the current study indicate the great potential for the practical implementation of PEF-assisted fermentation technology to improve yeast performances. However, further

investigations are required to understand the mechanisms behind microbial stimulation by PEF.

#### Author Contributions Section

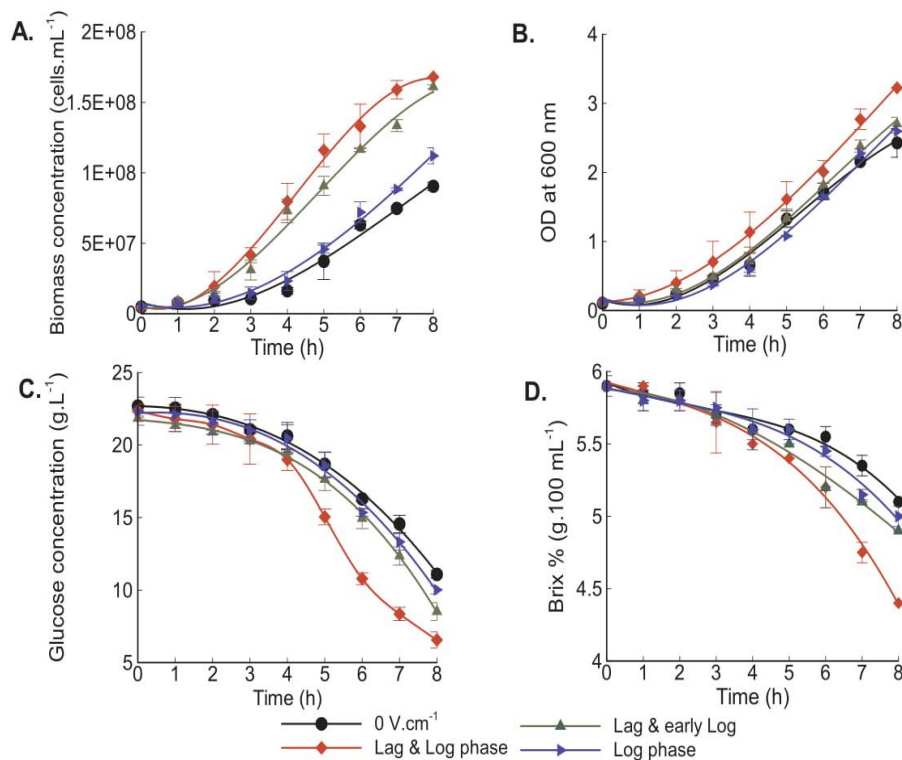
Mohamed KOUBAA conceived the PEF treatment chamber, supervised the research, and contributed to the writing of the article; Marina AL DACCACHE performed the experiments and the statistical analyses; Eugène VOROBIEV, Richard G. MAROUN, Dominique SALAMEH, and Nicolas LOUKA co-supervised the research, participated to the data analysis and results discussion, and reviewed the manuscript. All the authors contributed to data interpretation.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Lebanese National Council for Scientific research (CNRS-FS129). The authors wish to thank the Research council of Saint-Joseph University of Beirut, Project FS103. All the authors thank Dr. Nicolas Thiebault as well for his help in performing the HPLC analyses at ESCOM-Chimie (Compiègne, France).



**Fig. 6.** A. Growth kinetics of the control and the PEF-assisted fermentations at 285 V cm<sup>-1</sup> field intensity, during the “Lag and early exponential phase” and “Log phase”, and during both phases. B. Optical density measurements at 600 nm for the control and the PEF-assisted fermentations (285 V cm<sup>-1</sup>). C. Glucose consumption kinetics for the control and the PEF-assisted fermentations (285 V cm<sup>-1</sup>). D. Soluble compounds depletion kinetics for the control and the PEF-assisted fermentations (285 V cm<sup>-1</sup>).

#### References

Al Daccache, M., Salameh, D., Maroun, R., & Louka, N. (2017). New indigenous yeast strains “Hanseniaspora Meyeri-Libani” for the elaboration of cider”. Lebanon: Patent number: 12017/10-11265L.

Araújo, O. Q. F., Coelho, M. A. Z., Margarit, I. C. P., Vaz-junior, C. A., & Rocha-Leão, M. H. M. (2004). Electrical stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1–2), 97–103.

Barba, F. J., Koubaa, M., do Prado-Silva, L., Orlén, V., & de Souza Sant’Ana, A. (2017). Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 20–35.

Berg, H. (1995). Possibilities and problems of low frequency weak electromagnetic fields in cell biology 38, 153–159.

Capozzi, V., Berbegal, C., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., & Grieco, F. (2019). Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations. *LWT*, 109, 241–249.

Castro, I., Oliveira, C., Domingues, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2005). The effect of the electric field on lag-phase, ethanol and β-galactosidase production of a recombinant *S. cerevisiae* growing on lactose. Presented at the MERCOSUR congress on chemical engineering, Rio de Janeiro, Brazil.

de Arruda Moura Pietrowski, G., dos Santos, C. M. E., Sauer, E., Wosiacki, G., & Nogueira, A. (2012). Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9815–9821.

Doevenspeck, H. (1966). Process and apparatus for changing the charge of particles. Patent number: US3265605A.

El Zakhem, H., Lanoisellé, J.-L., Lebovka, N. I., Nonus, M., & Vorobiev, E. (2006). Behavior of yeast cells in aqueous suspension affected by pulsed electric field. *Journal of Colloid and Interface Science*, 300(2), 553–563.

Fologea, D., Vassu-Dimov, T., Stoica, I., Csutak, O., & Radu, M. (1998). Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 46(2), 285–287.

González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Garde-Cerdán, T., Portu, J., López, R., & Santamaría, P. (2018). Microbial inactivation and MLF performances of *Tempranillo* Rioja wines treated with PEF after alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 269, 19–26.

Góral, M., & Pankiewicz, U. (2017). Effect of pulsed electric fields (PEF) on accumulation of magnesium in *Lactobacillus rhamnosus* B 442 cells. *The Journal of Membrane Biology*, 250(5), 565–572.

Hart, F. X., & Palisano, J. R. (2017). The application of electric fields in biology and

medicine. In M. S. Kandelousi (Ed.), *Electric Field* (IntechOpen, pp. 161–186).

Kerns, G., Bauer, E., & Berg, H. (1993). Electrostimulation of cellulase fermentation by pulsatile electromagnetically induced currents. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 32(1), 89–94.

Liu, D., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2013). Impact of electric pulse treatment on selective extraction of intracellular compounds from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 576–584.

Martínez, J. M., Cebrián, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2016). Release of mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* autolysis induced by pulsed electric field. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01435>.

Martínez, J. M., Delso, C., Maza, M. A., Álvarez, I., & Raso, J. (2019). Pulsed electric fields accelerate release of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* during aging on the lees of Chardonnay wine. *Food Research International*, 116, 795–801.

Mattar, J. R., Turk, M. F., Nonus, M., Lebovka, N. I., El Zakhem, H., & Vorobiev, E. (2015). *S. cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments. *Bioelectrochemistry*, 103, 92–97.

Mattar, J. R., Turk, M. F., Nonus, M., Lebovka, N. I., Zakhem, H. E., & Vorobiev, E. (2014). Stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures by pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), 3328–3335.

Mattar, J., Turk, M., Nonus, M., Lebovka, N., & El Zakhem, Henri Vorobiev, E. (2013). Stimulation of grape juice fermentation using moderate pulsed electric field treatment. *Récents Progrès En Génie Des Procédés*, Ed. SFGP, Paris, France. N 104.

McCabe, A., Barron, N., McHale, L., & McHale, A. P. (1995). Increased efficiency of substrate utilization by exposure of the thermotolerant yeast strain, *Kluyveromyces marxianus* IMB3 to electric-field stimulation. *Biotechnology Techniques*, 9(2), 133–136.

McDonald, C. J., Lloyd, S. W., Vitale, M. A., Petersson, K., & Innings, F. (2000). Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric fields strengths of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science*, 65(6), 984–989.

Montanari, C., Tylewicz, U., Tabanelli, G., Berardinelli, A., Rocculi, P., Ragni, L., & Gardini, F. (2019). Heat-assisted pulsed electric field treatment for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of the presence of citral. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1737. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01737>.

Morales-de la Peña, M., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2011). Food preservation by pulsed electric fields: An engineering perspective. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 94–107.

Mota, M. J., Lopes, R. P., Koubaa, M., Roohinejad, S., Barba, F. J., Delgado, I., & Saraiva, J. A. (2018). Fermentation at non-conventional conditions in food- and bio-sciences by the application of advanced processing technologies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), 122–140.

Muniz, J. B., Marcelino, M., da Motta, M., Schuler, A., & da Motta, M. A. (2007). Influence of static magnetic fields on *S. cerevisiae* biomass growth. *Brazilian Archives of Biology*



### 3. Résultats et discussions

---

M. Al Daccache, et al.

Food Research International 129 (2020) 108840

- and *Technology*, 50(3), 515–520.
- Ohba, T., Uemura, K., & Nabetani, H. (2016). Moderate pulsed electric field treatment enhances exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subspecies cremoris. *Process Biochemistry*, 51(9), 1120–1128.
- Pando Bedriñana, R., Querol Simón, A., & Suárez Valles, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27(4), 503–508.
- Sitzmann, W. (2016). About the first industrial scale PEF – Plants and Heinz Doevenspeck's role – A historical review. In T. Jarm & P. Kramar (Eds.), *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies* (pp. 3–6). Springer Singapore.
- Stacey, M., Stickley, J., Fox, P., Statler, V., Schoenbach, K., Beebe, S. J., & Buescher, S. (2003). Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: Cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis. *Mutation Research*, 542(1–2), 65–75.
- Tanino, T., Sato, S., Oshige, M., & Ohshima, T. (2012). Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. *Journal of Electrostatics*, 70(2), 212–216.
- Teissié, J., Eynard, N., Vernhes, M. C., Bénichou, A., Ganeva, V., Galutzov, B., & Cabanes, P. A. (2002). Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review. *Bioelectrochemistry*, 55(1), 107–112.
- Valles, B. S., Bedriñana, R. P., Tascón, N. F., Simón, A. Q., & Madrera, R. R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24(1), 25–31.
- Vassu, T., Fologea, D., Csutak, O., Smarandache, D., Sasarman, E., Stoica, I., & Soare, S. (2004). Secondary effects of electroporation with bipolar electric pulses: Electrostimulation. *Romanian Biotechnological Letters*, 9, 1541–1544.
- Wang, M.-S., Wang, L.-H., Bekhit, A. E.-D. A., Yang, J., Hou, Z.-P., Wang, Y.-Z., ... Zeng, X.-A. (2018). A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing. *Journal of Food Engineering*, 223, 32–41.
- Yeo, S.-K., & Liang, M.-T. (2013). Effect of electroporation on viability and bioconversion of isoflavones in mannitol-soymilk fermented by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 396–409.
- Yeo, S.-K., Ong, J.-S., & Liang, M.-T. (2014). Effect of electroporation on bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parents and subsequent passages of *Bifidobacterium longum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(4), 1496–1509.

### 3. Résultats et discussions

---

#### 3.2.1.2. Contrôle du taux de conversion sucre/éthanol lors de la fermentation assistée par CEP d'une souche *Hanseniaspora* sp. pour la production de cidre à faible teneur en éthanol.

Une fois les paramètres de circulation et de CEP dans la chambre de traitement sont fixés, nous pourrions passer à l'étude des fermentations du jus de pommes assistées par CEP. Cet article porte sur l'étude de l'impact des CEP sur la souche *Hanseniaspora* sp. durant la fermentation du jus de pommes en vue de l'élaboration du cidre tout en contrôlant la conversion sucre/éthanol.

##### 3.2.1.2.1. Résumé de l'article

Cette étude évalue l'impact des CEP modérés sur la souche *Hanseniaspora* sp. lors des fermentations de jus de pomme. Les traitements ont été appliqués avant ou pendant la fermentation du jus de pommes en utilisant une intensité de 285 V/cm.

Dans la même optique de l'étude précédente, les fermentations contrôles sont des fermentations dans le jus de pommes sans traitement mais avec circulation dans la chambre de traitement à un débit de 75 mL/min. Quatre fermentations assistées par CEP ont été étudiées: 1) traitement durant les 12 premières heures de la fermentation comprenant la phase de latence, 2) traitement durant 12 h au cours de la phase exponentielle (après 12 h de fermentation), 3) fermentation du milieu inoculé avec une pré-culture traitée durant 6 h (pendant les phases de latence et exponentielle), et 4) traitement du jus durant 12 h de la phase exponentielle (après 12 h de fermentation) inoculé par une pré-culture préalablement traitée pendant 6 h.

Une augmentation significative de la croissance de la biomasse a été observée pour tous les traitements, ainsi qu'une diminution significative du rendement en éthanol. Des taux de production d'éthanol inférieurs ont été obtenus pour tous les échantillons prétraités et traités. Une réduction maximale de la teneur en éthanol de 1,6% (v, v) a été obtenue pour le traitement de la pré-culture pendant 6 h suivi de la fermentation sans traitement par CEP. La cinétique la plus rapide a été observée pour le traitement au cours des 12 premières heures de fermentation. Au cours de cette fermentation, la phase stationnaire était atteinte plus rapidement et le taux de croissance maximal de la biomasse était dix fois supérieur à celui obtenu avec la cinétique contrôle. Également, les cinétiques de croissance les plus rapides (le traitement au cours des 12 premières heures et le traitement de pré-culture) sont associées aux fermentations ayant les teneurs en éthanol les plus faibles. En outre, la souche *Hanseniaspora* sp. était plus sensible au traitement durant la phase de latence que pendant la phase exponentielle. Les résultats obtenus montrent la capacité de l'implémentation des CEP dans le procédé fermentaire pour réduire et contrôler la teneur en éthanol dans les boissons alcoolisées.

##### 3.2.1.2.2. Article: Control of the sugar/ethanol conversion rate during pulsed electric field-assisted fermentation of a *Hanseniaspora* sp. strain to produce low alcohol cider.

(Voir le manuscrit qui suit)



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ifset](http://www.elsevier.com/locate/ifset)

## Control of the sugar/ethanol conversion rate during moderate pulsed electric field-assisted fermentation of a *Hanseniaspora* sp. strain to produce low-alcohol cider

Marina Al Daccache<sup>a,b</sup>, Mohamed Koubaa<sup>c,\*</sup>, Dominique Salameh<sup>b</sup>, Eugène Vorobieva<sup>a</sup>,  
Richard G. Maroun<sup>b</sup>, Nicolas Louka<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA 4297 TIMR, Centre de recherche Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne cedex, France

<sup>b</sup> Faculté des Sciences, Centre d'Analyses et de Recherche, UR TVA, Laboratoire CTA, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon

<sup>c</sup> ESCOM, UTC, EA 4297 TIMR, 1 allée du réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Hanseniaspora* sp.  
Pulsed electric fields  
Fermentation  
Cider  
Low-alcohol content

### ABSTRACT

The effect of moderate pulsed electric fields (PEF) on *Hanseniaspora* sp. fermentations in apple juice was examined. The treatments were applied prior to or during the fermentation using a field strength of 285 V/cm. A significant increase ( $p < 0.05$ ) in the biomass growth was observed during all the treatments along with a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the ethanol yield. The optimal impact of PEF on ethanol reduction by 1.6% (v, v) was obtained during the treatment of the pre-culture for 6 h. The greatest rate was observed for the treatment during the first 12 h of the fermentation. During this fermentation performed at 28 °C under agitation at 250 rpm, the time to reach the stationary phase was reduced by 10 h, and the maximum biomass growth rate was ten-fold higher than that of the control. In addition, the sensitivity of *Hanseniaspora* sp. yeast to PEF treatment was more pronounced during the lag phase rather than the log phase in term of shortening the fermentation time, and reducing the ethanol content. The results obtained here demonstrated the promising efficiency of stimulated yeast by PEF in reducing the ethanol content in fermented alcoholic beverages.

### 1. Introduction

Over the last decade, an increase of the alcohol content in some alcoholic beverages such as wines has been observed worldwide (Godden, Wilkes, & Johnson, 2015; Tilloy, Ortiz-Julien, & Dequin, 2014). This behavior is most probably largely related to the intensification of global warming, which leads to the accumulation of higher sugar contents in the fruits (Alston, Fuller, Lapsley, & Soles, 2011; Samson et al., 2016). Increasing the alcohol content in the fermented fruit juices is undesired due to the associated drawbacks such as the deceleration of the fermentation kinetics (Malacrinò, Tosi, Caramia, Prisco, & Zapparoli, 2005), the reduced yeast activity, and the alteration of the beverage sensory quality (King, Dunn, & Heymann, 2013). Producing low alcoholic and non-alcoholic beverages such as wine, beer, and cider is attracting more and more attention due to the societal and health issues related to alcohol consumption.

Several approaches have been described in the literature leading obtaining low-alcohol beverages (Longo, Blackman, Torley, Rogiers, & Schmidtke, 2017; Schmidtke, Blackman, & Agboola, 2012). One of the

proposed solutions to decrease the alcohol level consists of reducing the sugar content in the fruits by for example modifying the cultivation practices, the fermentation of early-harvested fruits, or by diluting or membrane filtration of the juice (Novello & de Palma, 2013; Palliotti et al., 2014). However, it was observed that these methods seem to have a low impact on the ethanol concentration of the fermented juice (de Toda, Carlos Sancha González, & Balda, 2013; Heymann et al., 2013; Novello & de Palma, 2013; Palliotti et al., 2014). However, some of these techniques may alter the aroma and the mouthfeel of the product (Cassano, Mecchia, & Drioli, 2008; Echavarría, Torras, Pagán, & Ibarz, 2011; Heymann et al., 2013; Kontoudakis, Esteruelas, Fort, Canals, & Zamora, 2011; Salgado, Fernández-Fernández, Palacio, Hernández, & Prádanos, 2015). Another solution is to generate low-alcohol engineered yeasts, which are able to redirect the ethanol biosynthesis towards the production of by-products such as glycerol, acetaldehyde, and acetoin during the fermentation (Lopes et al., 2000; Tilloy, Cadière, Ehsani, & Dequin, 2015; Varela et al., 2015, 2012). Yet, another approach reducing the ethanol concentration during the fermentation is to stop the process before completion. Post-fermentation membrane

\* Corresponding author.

E-mail address: [m.koubaa@escom.fr](mailto:m.koubaa@escom.fr) (M. Koubaa).

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102258>

Received 28 May 2019; Received in revised form 15 November 2019; Accepted 15 November 2019

Available online 18 November 2019

1466-8564/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 3. Résultats et discussions

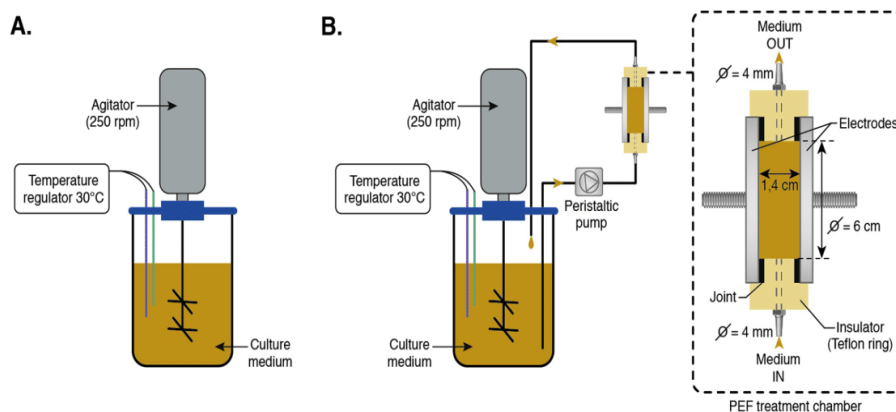


Fig. 1. A. Control batch mode fermentation without medium circulation, B. Control batch mode fermentation with medium circulation (without PEF treatment). Insert represents the dimensions of the PEF treatment chamber.

separation techniques including reverse osmosis (Bui, Dick, Moulin, & Galzy, 1986; Catarino, Mendes, Madeira, & Ferreira, 2007; Pilipovik & Riverol, 2005), evaporative perstraction (de Francesco, Freeman, Lee, Marconi, & Perretti, 2014; Varavuth, Jiratananon, & Atcharyawut, 2009), and pervaporation technology (del Olmo, Blanco, Palacio, Prádanos, & Hernández, 2014; Takács, Vatai, & Korányi, 2007) are generally the most applied methods that are agreed to reduce the ethanol concentrations in the fermented juices.

Due to all of the above-mentioned issues, developing new strategies that preserve the sensory and organoleptic properties of the fermented fruit juices along with reducing the ethanol content is of paramount importance. Pulsed electric field (PEF) assisted fermentation process seems to be a promising technique to solve the above-mentioned problems. In fact, the interaction of microorganisms with electric fields has intrigued microbiologists for many years since electrical current can increase or inhibit the growth of microorganisms, depending on the experimental conditions (Cho, Yousef, & Sastry, 1996). The influential parameters include the intensity of the electric field, its temporal function (e.g. constant and pulsed), the treatment time, the cell type, and the characteristics of the medium (Castro, Oliveira, Domingues, Teixeira, & Vicente, 2005). Thus, the PEF technology may represent a challenging technique to control the sugar/ethanol conversion rate in the fermented fruit juices. The review of the literature shows that the application of moderate PEF during the fermentation processes was the subject of a minor number of studies. Most of them were focused on the effect of PEF on the microbial cultures when treated prior to fermentation (Ki, Parameswaran, Popat, Rittmann, & Torres, 2015; Mattar et al., 2015). In this regard, the aim of this work was to investigate the effect of moderate pulsed electric field treatment on apple juice fermentation using the yeast *Hanseniaspora* sp. towards cider production. In fact, the genus *Hanseniaspora* was found as a major yeast developed during spontaneous apple juice fermentation (Pando Bedriñana, Querol Simón, & Suárez Valles, 2010; Valles, Bedriñana, Tascón, Simón, & Madrera, 2007). In addition, the positive impact of *Hanseniaspora* sp. in alcoholic fermentation has been demonstrated (Capozzi et al., 2019), which may positively contribute to the aroma profile of the fermented apple juice (de Arruda Moura Pietrowski, dos Santos, Sauer, Wosiacki, & Nogueira, 2012).

#### 2. Materials and methods

##### 2.1. Chemicals, yeast, and apples

Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), and peptone were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Yeast extract was bought from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Fructose and glucose were supplied by Merck Millipore (Guyancourt, France).

*Hanseniaspora* sp. strain used in this work belongs to the authors' laboratory collection. The strain was isolated previously from spontaneous fermentation of a Lebanese apple juice obtained from the "Ace Spur" variety (Al Daccache, Salameh, Maroun, & Louka, 2017). The Yeast-Extract-Peptone-Dextrose (YPD) medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) was used for the pre-culture yeast growth. The apples used in this work ("Ace spur" variety) were collected from Bqaatouta village (Keserwan region, Lebanon).

##### 2.2. Fermentation processes

###### 2.2.1. *Hanseniaspora* sp. pre-culture

The pre-culture of the *Hanseniaspora* sp. strain was performed by taking one colony from YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, and 2% agar) plate into 250 mL of YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) medium under sterile conditions (20 min at 121 °C in an autoclave HMC HV-110L (HMC Europe GmbH, Germany)). The pre-culture was incubated during 45 h at 30 °C temperature and 250-rpm agitation on a shaker (Thermo Scientific, France). A volume of 1.5 L of sterile YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) medium was introduced into a 2-L fermenter (LSL Biolafitte S.A.). After sterilization and cooling to 30 °C, the medium was inoculated by the pre-culture to get an initial concentration of 3.0×10<sup>6</sup> cells/mL. After 24-h incubation at 30 °C and 250 rpm, the pre-culture was used to inoculate the apple juice.

###### 2.2.2. Apple juice control fermentations

The apples were first washed and then used to extract the juice using a fruit juice centrifuge separator (Moulinex, France). A volume of 1.5 L of apple juice was introduced into a 2-L sterile fermenter and inoculated by the pre-culture to get an initial concentration of 3.0×10<sup>6</sup> cells/mL. Cider production was conducted for 100 h in batch mode, without medium circulation, at 30 °C and 250 rpm (Fig. 1A). The kinetics of growth, substrate consumption, and ethanol production were recorded during the fermentation. The content of soluble compounds was followed by measuring the "Brix using a digital refractometer (Anggur DR401, France). After recording the kinetics of growth and substrate consumption in batch mode without medium circulation, a treatment chamber was used to allow the circulation of the medium and the yeast treatment by PEF during the fermentation (Fig. 1B). A peristaltic pump allowed the medium circulation from the reactor to the treatment chamber and back into the reactor. A circulation flow rate of 75 mL/min, allowing obtaining the same growth and glucose consumption kinetics than in batch mode without circulation (Fig. 1A) was used. The total length of the tubes used was equal to 90 cm. The treatment chamber and the tubes were sterilized as above-mentioned.



### 3. Résultats et discussions

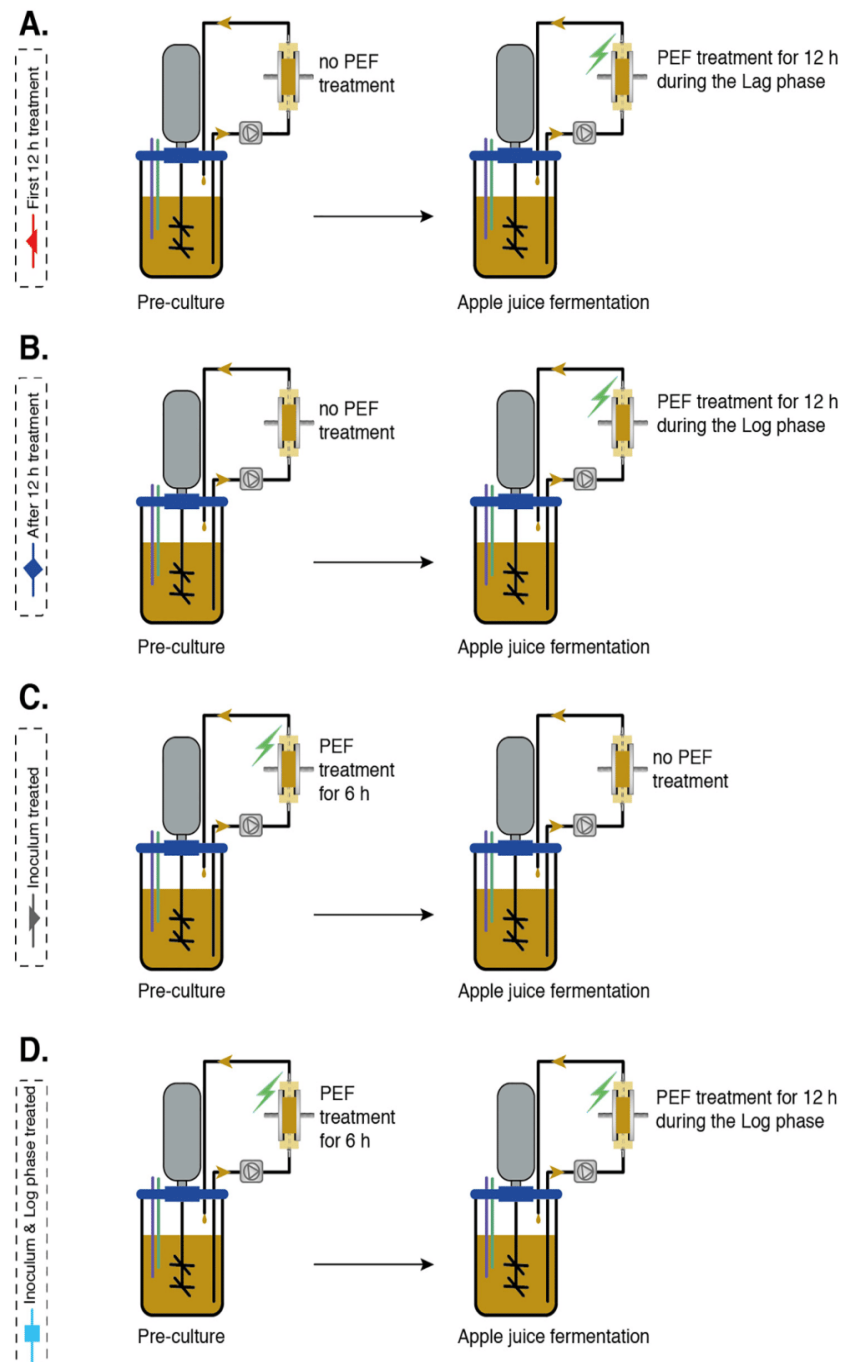


Fig. 2. PEF treatment during the fermentation processes (pre-culture and apple juice PEF-assisted fermentations). The symbols in the dashed inserts represent those used in Figs. 3 and 4 of the results and discussion section.

#### 2.2.3. Apple juice PEF-assisted fermentations

The impact of moderate pulsed electric fields on the growth, substrate consumption, and ethanol production by *Hanseniaspora* sp. yeast during apple juice fermentation was studied. For this purpose, the two electrodes of the PEF-treatment chamber were connected to a PEF generator made by the “Service électronique” of the University of Technology of Compiègne (France). This generator provides bipolar pulses of near rectangular shape, with the respective maximal delivered voltage and current of 400 V and 40 A. As the distance between the electrodes was set to 1.4 cm, the maximum field strength applied and used was 285 V/cm. A succession of  $N$  trains, each of them composed of

$n = 10$  pulses was applied. Each pulse duration was set to  $t_i = 100 \mu\text{s}$ , with a pulse period time of  $\Delta t = 1 \text{ ms}$ . The time between the trains was set to  $\Delta t_i = 1 \text{ s}$ . First, the PEF treatments were carried out during the lag and the log fermentation phases, and then during each phase separately. The impact of PEF-treatment of the pre-culture, followed by apple juice fermentation without PEF-treatment was also studied. The effective PEF treatment  $t_{PEF}$  was calculated as follows:  $t_{PEF} (\text{s}) = Nn \cdot t_i$  (s). Thus, four PEF-assisted fermentations were investigated (Fig. 2): 1) PEF-treatment for 12 h from the beginning of fermentation including the lag phase ( $t_{PEF} = 21.43 \text{ s}$ ), 2) PEF-treatment for 12 h during the log phase (after 12 h of fermentation) ( $t_{PEF} = 21.43 \text{ s}$ ), 3) fermentation of



the medium inoculated with treated pre-culture during 6 h ( $t_{PEF} = 10.72$  s) (during the lag and the log phases), and 4) fermentation of the medium treated for 12 h during the log phase (after 12 h of fermentation), which was inoculated by a pre-culture previously PEF-treated for 6 h ( $t_{PEF} = 10.72$  s + 21.43 s = 32.15 s).

The current  $I$  (A) and the voltage  $U$  (V) were recorded using a data logger and software developed by the "Service électronique" of the University of Technology of Compiègne (France). The specific power consumption of PEF treatment  $W$  (J/mL) was estimated by the summation of the power consumptions during each pulse as given in Eq. (1).

$$W \text{ (J/mL)} = \frac{U \cdot I \cdot t_{PEF}}{V} \quad (1)$$

where  $U$  is the voltage (V),  $I$  is the current intensity (A), and  $V$  is the volume of the culture medium in the bioreactor (mL).

#### 2.2.4. Determination of the growth, substrate consumption, and ethanol production kinetics

The kinetics of growth, substrate consumption, and ethanol production were recorded for all fermentations (control and PEF-assisted).

**2.2.4.1. Determination of the growth kinetics.** The growth kinetics were followed by the determination of the cell concentration (cells/mL) during the fermentation phases. Samples were taken periodically from the bioreactor, diluted several times in ultrapure water, and the cells were counted using a Thoma cell counting chamber (Preciss, France). To detect the viable cells, the samples were mixed volume to volume with a solution of 0.01% methylene blue. The biomass concentration  $X$  (cells/mL), the ethanol production rate  $\gamma$  ( $\text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{biomass}} \cdot \text{h}$ ), the biomass yield  $Y_{X/S}$  ( $\text{g}_{\text{biomass}}/\text{g}_{\text{substrate}}$ ), and the product yield  $Y_{P/S}$  ( $\text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{substrate}}$ ) were calculated respectively according to Eqs. (2), (3), (4) and (5).

$$X \text{ (cells/mL)} = \frac{a \cdot 250000 \cdot d}{b} \quad (2)$$

where  $a$  represents the number of cells counted,  $d$  represents the dilution factor,  $b$  represents the number of squares counted in the chamber, and 250000 corresponds to a constant included in the formula of the Thoma cell.

$$\gamma \text{ (g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{biomass}} \cdot \text{h}) = \frac{P_f - P_0}{X \cdot (t_f - t_0)} \quad (3)$$

$$Y_{X/S} \text{ (g}_{\text{biomass}}/\text{g}_{\text{substrate}}) = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (4)$$

$$Y_{P/S} \text{ (g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{substrate}}) = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (5)$$

where  $P_0$  and  $P_f$  represent respectively the initial and the final ethanol concentrations,  $X_0$  and  $X_f$  represent respectively the initial and the final biomass concentrations, and  $S_0$  and  $S_f$  represent respectively the initial and the final substrate concentrations.

The maximal specific growth rate  $\mu_{max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) was determined by plotting  $\ln X$  (cells/mL) versus the time (h).  $\mu_{max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) values corresponded to the slopes of the linear curves obtained during the exponential phases.

**2.2.4.2. Carbon substrates quantification.** The concentrations of carbon substrates were determined using high-performance liquid chromatography instrument LC-20AD (Shimadzu, Japan). The separation was performed in isocratic mode (a mixture of 1:4 (20:80) (v/v) water/acetonitrile with a flow rate of 3 mL/min), and using a Luna 5  $\mu\text{m}$   $\text{NH}_2$  250\*4.6 mm column. The separation temperature was set to 40 °C and the molecules were detected using a low-temperature evaporative light scattering detector ELSD-LT II (Shimadzu, Japan). The

samples taken during the fermentation processes were diluted 10 times in ultrapure water and a volume of 1  $\mu\text{L}$  was injected. The compounds' assignment and quantification were performed using pre-established standard curves of glucose (5–30 g/L) and fructose (2.5–30 g/L).

**2.2.4.3. Ethanol quantification.** Samples taken at different times of the fermentation processes were centrifuged at 6000 rpm for 10 min in order to eliminate the yeast suspensions and other apple particles. The ethanol content was determined by density measurements using a 5-mL glass pycnometer (Thermo Fisher, France). Calibration curve for ethanol quantification was performed using reconstituted solutions of apple juice/ethanol (1–10%, v/v).

#### 2.2.5. Statistical analyses

Each experiment was repeated, at least, three times. One-way ANOVA was used for the statistical analysis of the data with the help of Statgraphics Plus software (version 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). A significance level of 5% was taken for each analysis. The error bars presented in the figures correspond to the standard deviations.

### 3. Results and discussion

The impact of moderate PEF on ethanol accumulation was evaluated by treating *Hanseniaspora* sp. yeast during cider production. First, the different growth phases were identified during the conventional fermentation of the apple juice (without and with medium circulation, and without PEF application), which served as a control.

Results in Fig. 3A show an increase in the biomass concentration by around 25% when the apple juice yeast suspension was PEF-treated during or after the first 12 h of fermentation (Fig. 2A–B) and by around 45% when the inoculum was previously treated (Fig. 2C). These results concur with that of Mattar et al. (2014) who reported the stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cells under moderate PEF. In addition, many other works have been described in the literature reporting the increase in the biomass concentration by the application of moderate PEF, which were recently summarized and reviewed (Barba et al., 2015; Koubaa, Barba, Roohinejad, & Lorenzo, 2019; Mota et al., 2018). This increase in the biomass concentration could be explained by the increase of the yeast cells' division during the PEF treatment. The values of the maximal growth rate,  $\mu_{max}$  (Table 1) indicate a ten-fold acceleration of the growth kinetics for the PEF-assisted fermentation treated during the first 12 h (Fig. 2A). Consequently, the time to reach the stationary phase was reduced by 10 h. In addition, the treatment of the inoculum (Fig. 3C) showed a significant impact on the fermentation kinetics. In fact, higher  $\mu_{max}$  values were obtained compared to the control, which indicates that the stress applied to the yeasts during the pre-culture may influence the fermentation kinetics. The review of the literature shows that few studies have described the effect of electric field on the fermentation kinetics, which demonstrate mainly a significant acceleration of the PEF-assisted fermentations (Berovic, Potocnik, & Strus, 2008; Loghavi, Sastry, & Yousef, 2008; Mattar et al., 2015; Nakanishi, Tokuda, Soga, Yoshinaga, & Takeda, 1998).

Furthermore, the results presented in Fig. 3A demonstrate that the impact of moderate PEF treatment may differ from one growth phase to another. For instance, although the same energy (J/mL) was consumed for the treatments during either the first 12 h (lag phase) (Fig. 2A) or the second 12 h (log phase) of fermentation (Fig. 2B), the results obtained are significantly different (Table 1). In fact, the fermentation rate was significantly faster for the PEF-treated culture during the lag phase. These results concur with those reported by Mattar et al. (2013) who noticed an acceleration of the fermentation kinetics when stimulating *S. cerevisiae* cells by PEF during the lag phase. It has been also reported that the electroporation effectiveness was greater when PEF was applied during the first hours of fermentation, compared to that applied after 24 h of fermentation (Mattar et al., 2013). These observations also

### 3. Résultats et discussions

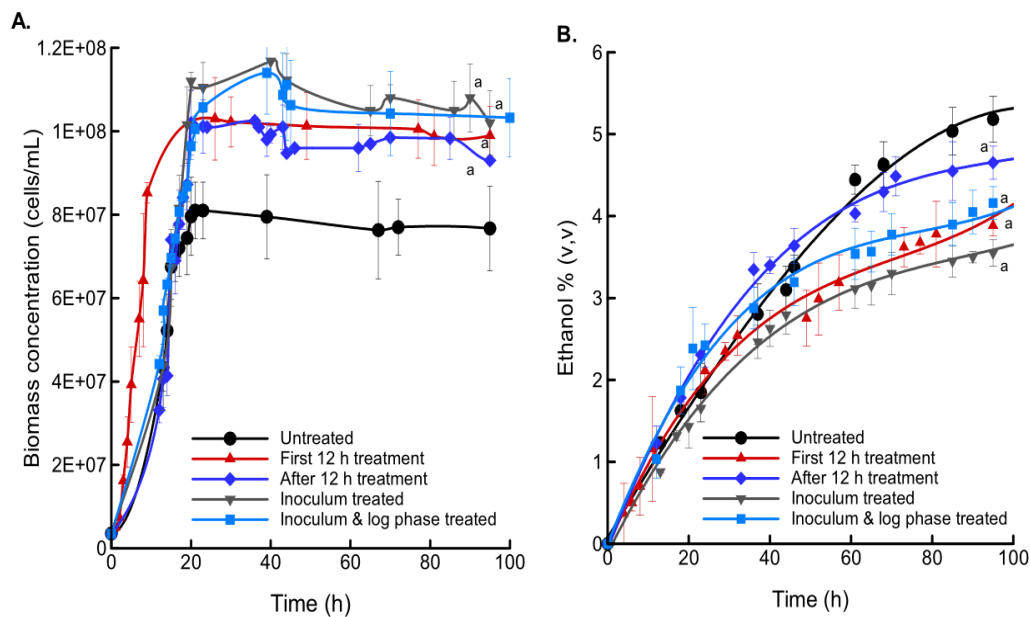


Fig. 3. Growth kinetics (A.) and ethanol kinetics (B.) for the control and the PEF-assisted fermentations, “a” denotes significant differences at the end of the fermentation, in comparison with the untreated samples.

concur with that of McDonald, Lloyd, Vitale, Petersson, and Innings (2000), who demonstrated that PEF has different effects on microorganisms depending on the growth phase.

The results in Fig. 3A show as well that the impact of moderate PEF treatment of the inoculum for 6 h and the log phase of the apple juice culture for 12 h (Fig. 2D) was similar to that of the PEF treatment of the inoculum alone (Fig. 2C) for 6 h. In fact, no significant differences were observed between the cell growth kinetics.

The impact of PEF treatment was also studied in term of ethanol accumulation. The results presented in Fig. 3B show that the ethanol content in the fermented apple juice depended on the PEF treatment applied, with significant differences observed. In all cases, the application of PEF led to decrease the ethanol content after 100 h of apple juice fermentation. To the best of our knowledge, this is the first time that moderate PEF is demonstrated to reduce the ethanol content in fermented beverages. In fact, some previous works such as that of Nakanishi and co-workers have reported an increase in the ethanol production when *S. cerevisiae* cells were treated by direct electric current (Nakanishi et al., 1998). These differences could be related to many factors including the PEF parameters and treatment duration, as well as the characteristics of the microorganism and the growth phase. The lowest ethanol decrease compared to the control was by 0.5% (v, v),

observed for the fermentation assisted by PEF during the log phase. The highest ethanol decrease was by 1.6% (v: v), compared to the control, and was observed for the fermentations inoculated with treated yeasts (Fig. 2C). Furthermore, lower ethanol production rates  $\gamma_{max}$  (Table 1) were obtained for all the pre-treated and treated samples. The lowest rate values were related to the pre-treated yeast and treated juice during the first 12 h of fermentation. The fastest growth kinetics observed for the treatment during the first 12 h and the pre-culture treatment (Fig. 3A) are associated to the fermentations having the lowest ethanol production rate and content (Fig. 3B). The reasons behind could be explained by the fact that the yeast cells are consuming sugars to produce more biomass and CO<sub>2</sub> rather than producing ethanol. In fact, when the biomass yield is significantly higher for the treated fermentations compared to that of the untreated ones, this was compensated by a decrease in the ethanol yield (Table 1). It was recently reported that applying an electric field could affect the reaction pathways by different mechanisms (Jiang, Feng, Zeng, & Luo, 2019). For instance, the electric field can have a direct effect on the charged particles that can pull them away from the reaction zone (Jiang et al., 2019), which may disturb the reactions of ethanol biosynthesis in the current study. In fact, during glycolysis, it is crucial to recycle the

Table 1  
Fermentation process performances, and energy consumptions during the PEF treatments. SD denotes standard deviation.

Treatment	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )		$\gamma_{max}$ (gethanol/gbiomass.h)		Y (g biomass/g fructose)		Y (g biomass/g glucose)		Y (g ethanol/g fructose)		Y (g ethanol/g glucose)		W (J/mL)	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD
Untreated	0.03	0.002	0.30	0.01	0.01	0.002	0.04	0.001	0.07	0.007	0.27	0.01	0	0
Treatment for 12 first hours	0.30 <sup>a</sup>	0.003	0.15 <sup>a</sup>	0.01	0.06 <sup>a</sup>	0.004	0.05	0.008	0.19 <sup>a</sup>	0.001	0.14 <sup>a</sup>	0.01	165	1.8
After 12 h (log phase treatment)	0.07 <sup>a</sup>	0.001	0.28	0.01	0.03	0.005	0.06	0.006	0.07	0.005	0.17 <sup>a</sup>	0.01	164	1.5
Treatment of the inoculum	0.10 <sup>a</sup>	0.002	0.16 <sup>a</sup>	0.01	0.03	0.004	0.06	0.004	0.08	0.004	0.17 <sup>a</sup>	0.01	82	1.2
Treatment of the inoculum and log phase	0.06 <sup>a</sup>	0.002	0.21 <sup>a</sup>	0.01	0.03	0.004	0.06	0.006	0.10 <sup>a</sup>	0.001	0.26	0.02	247	2.6

<sup>a</sup> Denotes significant differences with the untreated sample.

### 3. Résultats et discussions

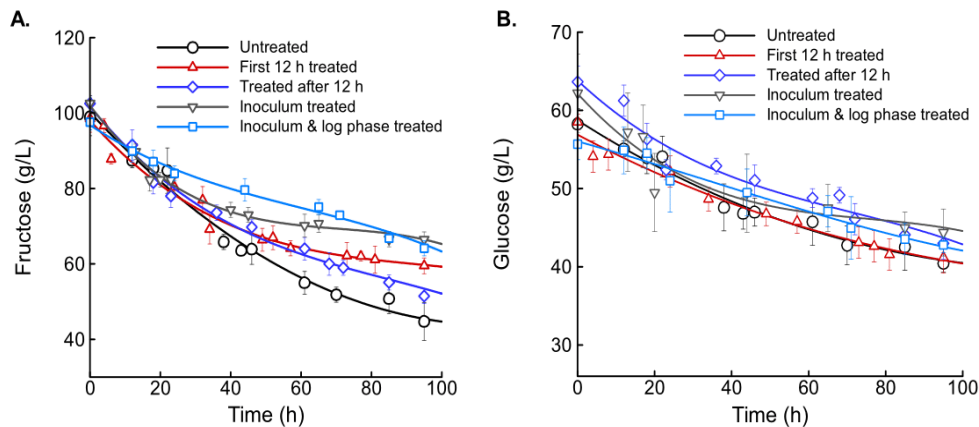


Fig. 4. Fructose (A.) and glucose (B.) consumption kinetics for the control and the PEF-assisted fermentations.

NAD<sup>+</sup> and oxidize the NADH, otherwise, a decrease in the glycolytic flux may occur, knowing that glycolysis is an important metabolic pathway for the ethanol production. A significant part of the NADH produced during the glycolysis is afterward oxidized during the ethanol formation (Kutyna, Varela, Henschke, Chambers, & Stanley, 2010). The alteration of the balance NAD<sup>+</sup>/NADH can redirect the carbon flux towards different end-points. This alteration could take place during the PEF treatment since it has an impact on the charged particles as mentioned above.

The yeast growth and ethanol production were obviously associated with the consumption of substrates. Here, mainly glucose and fructose were consumed during the apple juice fermentation. Similar to the above-discussed kinetics, the decrease in the concentrations of substrates depended on the PEF treatment (Fig. 4). This behavior was previously observed when using mutants for ethanol production. For instance, Tilloy et al. (2015) cultivated strains of *S. cerevisiae* wine yeasts under hyperosmotic stress in order to redirect the ethanol synthesis towards the glycerol formation. All the strains showed a reduced ethanol yield compared to the reference strain. In addition, the mutants showed reduced sugar consumption, and the authors established a correlation between the reduced ethanol yield, the high glycerol yield, and the decrease in the fermentative properties.

Regarding the energy consumption, the PEF-treatment of the pre-culture during 6 h consumed less energy (Table 1) than the other PEF-assisted fermentations and provided the highest ethanol reduction in the fermented apple juice. Applying 82 J/mL reduced the final ethanol concentration by 1.6% (v/v), compared to the control. The conventional methods used to remove partially the ethanol from beverages, such as vacuum distillation, requires higher energy consumption and higher cost than that demonstrated here (Margallo et al., 2015; Schmidtke et al., 2012). In addition, the use of genetically modified yeasts producing less ethanol is not only restricted by the consumers' resistance to genetically modified food products (Chambers & Pretorius, 2010), but also by the complexity of the biological systems and their understanding which can limit the engineering processes (Williams, Pretorius, & Paulsen, 2016). From another perspective, the application of the conventional methods, involving the use of heat, may induce the loss of flavors and the organoleptic properties (Scott & Jarvis, 1995). In addition, retention of the compounds affecting the product aroma may occur during the membrane filtration (Catarino et al., 2007). Compared to the results obtained in the current study, it could be underlined that moderate PEF treatment could be a challenging solution to reduce the ethanol content in alcoholic beverages and to control the sugar/ethanol conversion rate without affecting the sensory properties of cider. In fact, it has been previously demonstrated that PEF-treated cider had a better color and aroma retention than the thermally processed samples (Azhualappil, Fan, Geveke, & Zhang, 2010). Nonetheless, organoleptic

investigations are required in order to evaluate the volatile organic compounds and the aromatic profile of the untreated and PEF-treated ciders.

#### 4. Conclusions

In this work, the impact of moderate PEF treatment on *Hanseniaspora* sp. cells was studied during the apple juice fermentation. For an effective PEF-treatment time of 10.716 s applied to the pre-culture during 6 h, the highest alcohol reduction was observed. The yeast concentration and the biomass yield increased significantly, while the ethanol production rate was reduced by the half. In addition, the yeast cells were more sensitive to moderate PEF treatment during the first hours of fermentation rather than during the log phase, even though the same energy was used. The yeast concentration and the biomass yield increased significantly for all the treatments. However, the fastest kinetic was observed for the treatment during the first 12 h of fermentation. The increased growth rates were accompanied by decreased ethanol rates and contents.

The results indicate the great potential for practical implementation of PEF-assisted fermentation technology to reduce the ethanol content during the fermentation processes and especially using *Hanseniaspora* sp. yeast cells. However, further investigations are required in order to understand the mechanisms behind the microbial stimulation and ethanol reduction.

#### Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank the Research council of Saint Joseph University of Beirut, Project FS103 and the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-FS129). All the authors thank Dr. Nicolas Thiebault as well for his help in performing the HPLC analyses at ESCOM-Chimie (Compiègne, France).

#### References

- Al Daccache, M., Salameh, D., Maroun, R., & Louka, N. (2017). *New indigenous yeast strains "Hanseniaspora Meyeri-Libani" for the elaboration of cider*. Lebanon: Patent number: 12017/10-11265L.
- Alston, J. M., Fuller, K. B., Lapsley, J. T., & Soleas, G. (2011). Too much of a good thing? Causes and consequences of increases in sugar content of California wine grapes. *Journal of Wine Economics*, 6(2), 135–159.
- Azhualappil, Z., Fan, X., Geveke, D. J., & Zhang, H. Q. (2010). Thermal and nonthermal processing of apple cider: Storage quality under equivalent process conditions. *Journal of Food Quality*, 33(5), 612–631.



### 3. Résultats et discussions

M. Al Daccache, et al.

Innovative Food Science and Emerging Technologies 59 (2020) 102258

- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., ... Vorobiev, E. (2015). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77(Part 4), 773–798.
- Berovic, M., Potocnik, M., & Strus, J. (2008). The influence of galvanic field on *Saccharomyces cerevisiae* in grape must fermentation. *Vitis*, 47(2), 117–122.
- Bui, K., Dick, R., Moulin, G., & Galzy, P. (1986). A reverse osmosis for the production of low ethanol content wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(4), 297–300.
- Capozzi, V., Berbegal, C., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., & Grieco, F. (2019). Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations. *LWT*, 109, 241–249.
- Cassano, A., Mecchia, A., & Drioli, E. (2008). Analyses of hydrodynamic resistances and operating parameters in the ultrafiltration of grape must. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 171–177.
- Castro, I., Oliveira, C., Domingues, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2005). The effect of the electric field on lag-phase, ethanol and  $\beta$ -galactosidase production of a recombinant *S. cerevisiae* growing on lactose. Presented at the MERCOSUR congress on chemical engineering, Rio de Janeiro, Brazil.
- Catarino, M., Mendes, A., Madeira, L. M., & Ferreira, A. (2007). Alcohol removal from beer by reverse osmosis. *Separation Science and Technology*, 42(13), 3011–3027.
- Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: The history of wine-making, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11(12), 914–920.
- Cho, H. Y., Yousef, A. E., & Sastry, S. K. (1996). Growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus* under ohmic heating. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(3), 334–340.
- de Arruda Moura Pietrowski, G., dos Santos, C. M. E., Sauer, E., Wosiacki, G., & Nogueira, A. (2012). Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9815–9821.
- de Francesco, G., Freeman, G., Lee, E., Marconi, O., & Perretti, G. (2014). Effect of operating conditions during low-alcohol beer production by osmotic distillation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3279–3286.
- de Toda, F., Carlos Sancha González, J., & Balda, P. (2013). Reducing the sugar and pH of the grape ("*Vitis vinifera*") L. cvs. "Grenache" and "Tempranillo" through a single shoot trimming. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 34, 246–251.
- del Olmo, Á., Blanco, C. A., Palacio, L., Prádanos, P., & Hernández, A. (2014). Pervaporation methodology for improving alcohol-free beer quality through aroma recovery. *Journal of Food Engineering*, 133, 1–8.
- Echavarría, A. P., Torras, C., Pagán, J., & Ibarz, A. (2011). Fruit juice processing and membrane technology application. *Food Engineering Reviews*, 3(3), 136–158.
- Godden, P., Wilkes, E., & Johnson, D. (2015). Trends in the composition of Australian wine 1984–2014. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(S1), 741–753.
- Heymann, H., LiCalzi, M., Conversano, M. R., Bauer, A., Skogerson, K., & Matthews, M. (2013). Effects of extended grape ripening with or without must and wine alcohol manipulations on cabernet sauvignon wine sensory characteristics. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(1), 86–99.
- Jiang, X. Z., Feng, M., Zeng, W., & Luo, K. H. (2019). Study of mechanisms for electric field effects on ethanol oxidation via reactive force field molecular dynamics. *Proceedings of the Combustion Institute*, 37(4), 5525–5535.
- Ki, D., Parameswaran, P., Popat, S. C., Rittmann, B. E., & Torres, C. I. (2015). Effects of pre-fermentation and pulsed-electric-field treatment of primary sludge in microbial electrochemical cells. *Bioresource Technology*, 195, 83–88.
- King, E. S., Dunn, R. L., & Heymann, H. (2013). The influence of alcohol on the sensory perception of red wines. *Food Quality and Preference*, 28(1), 235–243.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2011). Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 230–238.
- Koubaa, M., Barba, F. J., Roohinejad, S. J. J., & Lorenzo, J. M. (2019). New challenges and opportunities of food fermentation processes: Application of conventional and innovative techniques. *Food Research International*, 115, 552–553.
- Kutyna, D. R., Varela, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010). Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends in Food Science & Technology*, 21(6), 293–302.
- Loghavi, L., Sastry, S. K., & Yousef, A. E. (2008). Effect of moderate electric field frequency on growth kinetics and metabolic activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*, 24(1), 148–153.
- Longo, R., Blackman, J. W., Torley, P. J., Rogiers, S. Y., & Schmidtke, L. M. (2017). Changes in volatile composition and sensory attributes of wines during alcohol content reduction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 8–16.
- Lopes, M. D. B., Rehman, A., Gockowiak, H., Heinrich, A. J., Langridge, P., & Henschke, P. A. (2000). Fermentation properties of a wine yeast over-expressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (GPD2). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(3), 208–215.
- Malacrinò, P., Tosi, E., Caramia, G., Prisco, R., & Zapparoli, G. (2005). The vinification of partially dried grapes: A comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high sugar stress. *Letters in Applied Microbiology*, 40(6), 466–472.
- Margallo, M., Aldaco, R., Barceló, A., Diban, N., Ortiz, I., & Irabien, A. (2015). Life cycle assessment of technologies for partial dealcoholisation of wines. *Sustainable Production and Consumption*, 2, 29–39.
- Mattar, J. R., Turk, M. F., Nonus, M., Lebovka, N. I., El Zakhem, H., & Vorobiev, E. (2013). Stimulation of grape juice fermentation using moderate pulsed electric field treatment. *Récents Progrès En Génie Des Procédés* (pp. 104).
- Mattar, J. R., Turk, M. F., Nonus, M., Lebovka, N. I., El Zakhem, H., & Vorobiev, E. (2015). *S. cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments. *Bioelectrochemistry*, 103, 92–97.
- Mattar, J. R., Turk, M. F., Nonus, M., Lebovka, N. I., Zakhem, H. E., & Vorobiev, E. (2014). Stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures by pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), 3328–3335.
- McDonald, C. J., Lloyd, S. W., Vitale, M. A., Petersson, K., & Innings, F. (2000). Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric fields strengths of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science*, 65(6), 984–989.
- Mota, M. J., Lopes, R. P., Koubaa, M., Roohinejad, S., Barba, F. J., Delgado, I., & Saraiva, J. A. (2018). Fermentation at non-conventional conditions in food- and bio-sciences by the application of advanced processing technologies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), 122–140.
- Nakanishi, K., Tokuda, H., Soga, T., Yoshinaga, T., & Takeda, M. (1998). Effect of electric current on growth and alcohol production by yeast cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(2), 250–253.
- Novello, V., & de Palma, L. (2013). Viticultural strategy to reduce alcohol levels in wine. *Alcohol level reduction in wine* (pp. 3–8). Oenoviti International Network.
- Pallioti, A., Tombesi, S., Silvestroni, O., Lanari, V., Gatti, M., & Poni, S. (2014). Changes in vineyard establishment and canopy management urged by earlier climate-related grape ripening: A review. *Scientia Horticulturae*, 178, 43–54.
- Pando Bedriñana, R., Querol Simón, A., & Suárez Valles, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27(4), 503–508.
- Pilipovik, M. V., & Riverol, C. (2005). Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 69(4), 437–441.
- Salgado, C. M., Fernández-Fernández, E., Palacio, L., Hernández, A., & Prádanos, P. (2015). Alcohol reduction in red and white wines by nanofiltration of musts before fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 96, 285–295.
- Samson, A., Dequin, S., Bes, M., Noble, J., Aguera, E., Linéard, P., & Escudier, J. L. (2016). *Pratiques œnologiques: les dernières tendances en lien avec l'évolution climatique?* 23–28 (Toulouse, France).
- Schmidtke, L. M., Blackman, J. W., & Agboola, S. O. (2012). Production technologies for reduced alcoholic wines. *Journal of Food Science*, 77(1), R25–R41.
- Scott, J., & Jarvis, B. (1995). Removal of alcohol from beverages. In R. D. Board, D. Jones, & B. Jarvis (Eds.), *Microbial fermentations: Beverages, foods and feeds*. Cambridge: Oxford: Blackwell Science.
- Takács, L., Vatai, G., & Korány, K. (2007). Production of alcohol free wine by pervaporation. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 118–125.
- Tilloy, V., Cadière, A., Ehsani, M., & Dequin, S. (2015). Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 49–58.
- Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2014). Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2623–2632.
- Valles, B. S., Bedriñana, R. P., Tascón, N. F., Simón, A. Q., & Madrera, R. R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24(1), 25–31.
- Varavuth, S., Jiraratananon, R., & Atcharyawut, S. (2009). Experimental study on dealcoholization of wine by osmotic distillation process. *Separation and Purification Technology*, 66(2), 313–321.
- Varela, C., Dry, P. R., Kutyna, D. R., Francis, I. L., Henschke, P. A., Curtin, C. D., & Chambers, P. J. (2015). Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 670–679.
- Varela, C., Kutyna, D. R., Solomon, M. R., Black, C. A., Borneman, A., Henschke, P. A., ... Chambers, P. J. (2012). Evaluation of gene modification strategies for the development of low-alcohol-wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6068–6077.
- Williams, T. C., Pretorius, I. S., & Paulsen, I. T. (2016). Synthetic evolution of metabolic productivity using biosensors. *Trends in Biotechnology*, 34(5), 371–381.

#### 3.2.2. Fermentations assistées par US de la souche *Hanseniaspora* sp. pour la production de cidre à partir de pommes libanaises.

##### 3.2.2.1. Résumé de l'article

Cette étude évalue l'impact des US de faible intensité sur la fermentation de jus de pomme de la levure *Hanseniaspora* sp. Dans la même optique des études précédentes, une chambre de traitement par US a été conçue pour cette étude, permettant le recyclage du milieu de culture et le traitement de la levure pendant la fermentation. Le volume de la chambre, le débit de circulation, et la longueur des tuyauteries étaient les mêmes que ceux de la chambre utilisée pour le traitement par CEP. Les paramètres de traitements par US ont été d'abord optimisés sur un milieu synthétique où les cinétiques fermentaires sont plus rapides. Les fréquences de traitement était choisie comme suit : 0,5 – 1 ou 2 s d'application des US suivi de 6 s de repos. Les traitements ont été appliqués durant les 6 premières heures de fermentations comprenant les deux phases de latence et exponentielle.

Les résultats de l'étude ont montré que l'application des impulsions de 2 s suivies de 6 s de repos semble inactiver la croissance après 6 h de traitement. La fréquence de traitement ayant l'effet stimulant le plus important sur la croissance de la levure et la consommation du glucose a été obtenue pour 0,5 s de traitement suivi 6 s de repos. Ce traitement a permis d'obtenir une augmentation significative de 63% de la concentration finale de la biomasse. Les résultats ont montré de même que la consommation du glucose était plus rapide pour les cultures traitées par US par rapport au control. La souche *Hanseniaspora* sp. semble être plus sensible au traitement durant la phase de latence que durant la phase exponentielle.

Après l'optimisation des paramètres de traitement sur un milieu synthétique, l'impact des US a été étudié lors de la fermentation du jus de pomme. Les traitements ont été effectués soit sur la pré-culture soit durant les 12 premières heures de fermentation. Une augmentation significative de la croissance de la biomasse a été observée durant les différents traitements ainsi qu'une diminution significative du rendement en éthanol. Une augmentation de la concentration de la biomasse d'environ 52% a été notée lorsque la suspension de levure a été traitée par US au cours des 12 premières heures de fermentation, et de 42% lorsque l'inoculum a été traité. La réduction maximale de la teneur en éthanol était de 0,55% (v, v) obtenue pour les fermentations traitées durant les 12 premières heures de fermentation. Au cours de cette fermentation, la phase stationnaire était atteinte plus rapidement et le taux de croissance maximal de la biomasse était de dix fois plus important que celui des fermentations contrôles. Les résultats ont montré aussi une augmentation de la consommation de glucose, alors que la même quantité de fructose était utilisée pour les fermentations traitées et non traitées. Les résultats obtenus ont souligné ainsi le potentiel de l'application des US pour réduire la teneur en éthanol dans les boissons alcoolisées.

#### 3.2.2.2. Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples

(Voir le manuscrit qui suit)

## **Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples**

Marina AL DACCACHE <sup>1,2</sup>, Mohamed KOUBAA <sup>3\*</sup>, Dominique SALAMEH <sup>2</sup>, Richard G. MAROUN <sup>2</sup>, Nicolas LOUKA <sup>2</sup>, Eugène VOROBIEV <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA 4297 TIMR, Centre de recherche Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne cedex, France.

<sup>2</sup> Faculté des Sciences, Centre d'Analyses et de Recherche, UR TVA, Laboratoire CTA, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon

<sup>3</sup> ESCOM, UTC, EA 4297 TIMR, 1 allée du réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France.

Publié dans le journal *Ultrasonics Sonochemistry*



Contents lists available at ScienceDirect

Ultrasonics - Sonochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ultson](http://www.elsevier.com/locate/ultson)

## Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples

Marina Al Daccache<sup>a,b</sup>, Mohamed Koubaa<sup>c,\*</sup>, Dominique Salameh<sup>b</sup>, Richard G. Maroun<sup>b</sup>,  
Nicolas Louka<sup>b</sup>, Eugène Vorobiev<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA 4297 TIMR, Centre de recherche Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne cedex, France

<sup>b</sup> Faculté des Sciences, Centre d'Analyses et de Recherche, UR TVA, Laboratoire CTA, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon

<sup>c</sup> ESCOM, UTC, EA 4297 TIMR, 1 allée du réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Hanseniaspora* sp.  
Ultrasound-assisted fermentation  
Stimulation  
Cider  
Low alcohol content  
Lebanese apples

### ABSTRACT

The present work studies the impact of low-intensity ultrasound (US) on *Hanseniaspora* sp. yeast fermentations. The effect of pulse duration and growth phase on US application was first evaluated using a synthetic medium. The optimal conditions were then applied to apple juice US-assisted fermentation. An US treatment chamber was first designed to allow the recycling of the culture medium. The optimal US pulse duration on the yeast growth rate was of 0.5 s followed by 6 s rest period, and during 6 h of both Lag and Log phases. These US parameters led to a faster consumption of glucose in the medium during the fermentation, compared to the untreated culture. The impact of US was also depending on the growth phase, showing higher sensitivity of the yeast to US during the Lag phase rather than the Log phase. US-assisted fermentation of apple juice showed a significant increase in biomass growth and glucose consumption, along with a significant decrease in the ethanol yield. The fastest growth kinetic (by 52%), and the highest ethanol reduction (by 0.55% (v, v)) were obtained for the treatment during the first 12 h of fermentation, thereby, the stationary phase was reached faster, and the maximum biomass growth rate was 10 folds higher compared to the untreated culture. The results obtained in this study demonstrated the promising efficiency of US-assisted fermentation in stimulating the biomass growth and reducing the ethanol content in alcoholic beverages.

### 1. Introduction

Ultrasound (US) is defined as acoustic waves whose frequency is equal or greater than 20 kHz. It has been widely applied in medical diagnosis, sonochemical treatment, ultrasonic cleaning of surfaces, and in submarines [1,2]. Most applications for microbial inactivation in food processing use low frequency US, with a frequency ranging from 20 to 100 kHz [1,3]. This is mainly related to the several benefits of US, which is considered as “green” technology, compared to conventional processes. The benefits of US include shortening the processing time (seconds to minutes) with high reproducibility and accuracy, reducing the processing cost, generating highly pure product, eliminating some of the downstream purification steps, as well as reducing the post-treatment of wastewater [4,5].

While high-intensity US (10–1000 W·cm<sup>-2</sup>) is usually effective in disrupting microbial cells, low-intensity US (less than 10 W·cm<sup>-2</sup>) can result in an intensification of several biotechnological processes without damaging the cells [1,6,7]. The mechanisms underlying productivity improvements have not been so far identified, although

factors such as improved gas–liquid mass transfer (liquid phase gas absorption) and solid–liquid mass transfer (dissolution of a solid in the liquid phase) play an important role [8]. Furthermore, US induces cavitation that generates microbubbles at different sites of the liquid. The formed microbubbles grow during the rarefaction phase and then implode and collapse during the compression phase, releasing thereby a wave shock in the medium [4]. Besides, pressure fluctuation during US treatments can induce stress on the cells, possibly promoting cell growth and proliferation, as well as changes in the metabolic processes [8–10].

Several applications of low-intensity US have been described in food processing, and particularly in food fermentation to improve the performance of microorganisms, and the quality of the end product [11–13]. It has been reported that the application of US in the dairy fermentation can induce some modifications in macromolecules such as enzymes [14,15], reduce the yogurt fermentation time [16,17], and improve the yogurt's rheological properties [18]. Besides, US was used for the proliferation of probiotics (e.g. *Bifidobacterium* sp.), which caused an increase in the lactose hydrolysis, and transgalactosylation in

\* Corresponding author.

E-mail address: [m.koubaa@escom.fr](mailto:m.koubaa@escom.fr) (M. Koubaa).

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104952>

Received 28 October 2019; Received in revised form 25 December 2019; Accepted 27 December 2019

Available online 28 December 2019

1350-4177/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



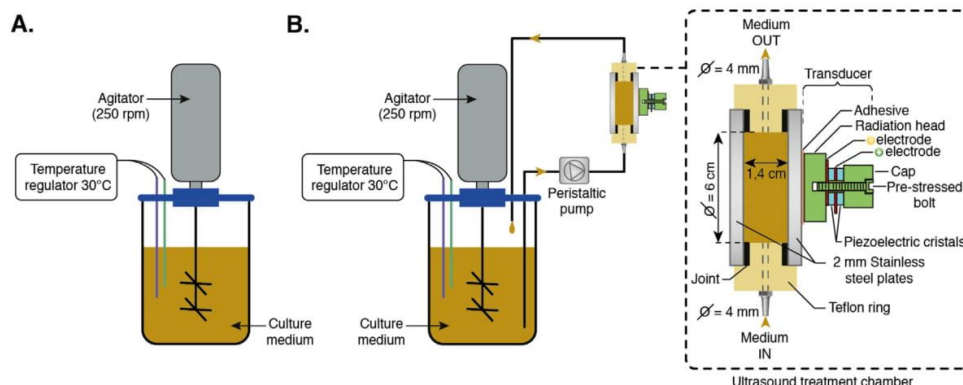


Fig. 1. A. Control batch mode fermentation without medium circulation, B. Control batch mode fermentation with medium circulation (without US treatment). Insert represents a schematic diagram of the designed treatment chamber.

milk [19,20].

One of the promising fields described in the literature for the application of US-assisted fermentation is the production of alcoholic beverages. For instance, Matsuura and co-workers reported a significant reduction of wine and beer fermentation time (by 50%) when applying US intensity of  $30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  with a frequency of 43 kHz. An acceleration of ethanol production and a decrease in the dissolved  $\text{CO}_2$  were also noted [21]. A similar observation was reported by Lanchun and co-workers by applying US with a frequency of 24 kHz, a power of 2 W, and a stimulation time of 1 s after intermitting for 15 s during 30 min of the exponential phase [22]. Results showed growth acceleration by 33% of the *Saccharomyces cerevisiae* cells. The impact of US depends as well on the period of growth phase (e.g. adaptation, exponential, etc). For example, the effect of the energy applied during the Lag phase of *S. cerevisiae* yeast culture was studied [23]. Applying US energy between  $330$  and  $360 \text{ W}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-3}$  decreased the Lag phase duration by 1 h compared to the untreated suspension, whereas applying higher energy than  $850 \text{ W}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-3}$  led to a longer Lag phase and a growth reduction. There is a great variability in the sensitivity of different microorganisms to US, which strongly depends on the properties of the medium and the parameters of the treatment (intermittent or continuous application of US). For example, it has been shown that the intermittent sonication ( $25 \text{ kHz}$ ,  $300 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ ) of *S. cerevisiae* yeasts throughout the fermentation more than doubled the ethanol yield, whereas the same effect did not occur for the continuously-treated cultures [24]. A 4-fold increase in ethanol productivity was observed when applying US ( $35 \text{ kHz}$ ,  $1.48 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) to a 10% cycle (equivalent to sonication for 1 min followed by a rest period of 9 min) on *S. cerevisiae* MTCC 170 [25]. By contrast, a recent study has reported that the application of either direct US (at different intensities ranging from  $23$  to  $32 \text{ W}\cdot\text{L}^{-1}$ ) or indirect US ( $1.4 \text{ W}\cdot\text{L}^{-1}$  intensity) had negative effects on yeast performances [26]. Both reductions in the rates of glucose consumption and ethanol production were also observed.

Thus, high variability was observed for the impact of US on fermentation, which depends on the type of microorganism, the US parameters, the growth phase, etc. This makes understanding the mechanisms underlying the process more difficult, and therefore more studies are required. In this line, the current work is devoted to study the impact of US-assisted fermentation on *Hanseniaspora* sp. growth and glucose uptake during cider production. The genus *Hanseniaspora* was the major yeast developed during spontaneous apple juice fermentation [27,28]. Besides, Capozzi and co-workers demonstrated the positive impact of *Hanseniaspora* sp. in alcoholic fermentation and in cider fermentation [29], which can positively contribute to the aroma profile of the fermented apple juice [30].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals, yeast, and apples

Peptone and ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) were bought from Fisher Scientific (Illkirch, France). Yeast extract was supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Glucose and fructose were provided by Merck Millipore (Guyancourt, France).

*Hanseniaspora* sp. strain used in this work belongs to the authors' laboratory collection. The strain was isolated previously from spontaneous fermentation of a Lebanese apple juice obtained from the "Ace spur" variety [31].

The apples ("Ace spur" variety) used to conduct fermentation experiments were supplied from Bqaatouta village (Keserwan region, Lebanon).

### 2.2. Fermentation processes

#### 2.2.1. *Hanseniaspora* sp. pre-culture

The pre-culture of the *Hanseniaspora* sp. strain was performed by taking one colony from YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, and 2% agar) plate into 250 mL of YPD (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) medium under sterile conditions (20 min at  $121^\circ\text{C}$  in an autoclave HMC HV-110L (HMC Europe GmbH, Germany)). The pre-culture was incubated during 45 h at  $30^\circ\text{C}$  temperature and 250 rpm agitation speed in a shaker (Thermo Scientific, France).

#### 2.2.2. Fermentations in synthetic medium

**2.2.2.1. Control fermentations.** A volume of 1.5 L of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) was introduced into a 2-L fermenter (LSL Biolafitte S.A.). After sterilization as above-mentioned and cooling to  $30^\circ\text{C}$ , the medium was inoculated by a pre-culture to get an initial concentration of  $4.5 \times 10^6 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The control fermentation in batch mode without medium circulation (Fig. 1.A) was performed at 250 rpm agitation speed, and the temperature was maintained at  $30^\circ\text{C}$ . After recording the kinetics of growth and glucose consumption in batch mode without medium circulation, a treatment chamber was designed to allow the circulation of the medium and the yeast treatment by US during the fermentation (Fig. 1.B). For this purpose, two parallel stainless-steel plates (3 mm width, 6 cm diameter) were fixed between two Teflon rings creating a channel for the flowing liquid. The volume of the treatment chamber was around 40 mL (corresponding to a ratio of 1:50 between the volume of the fermenter and the volume of the chamber). Two pipe fitting connectors were adjoined to make it run as a continuous chamber. A transducer (100 W, 40 kHz) fixed to the chamber and connected to the power supply (220 V) converted the

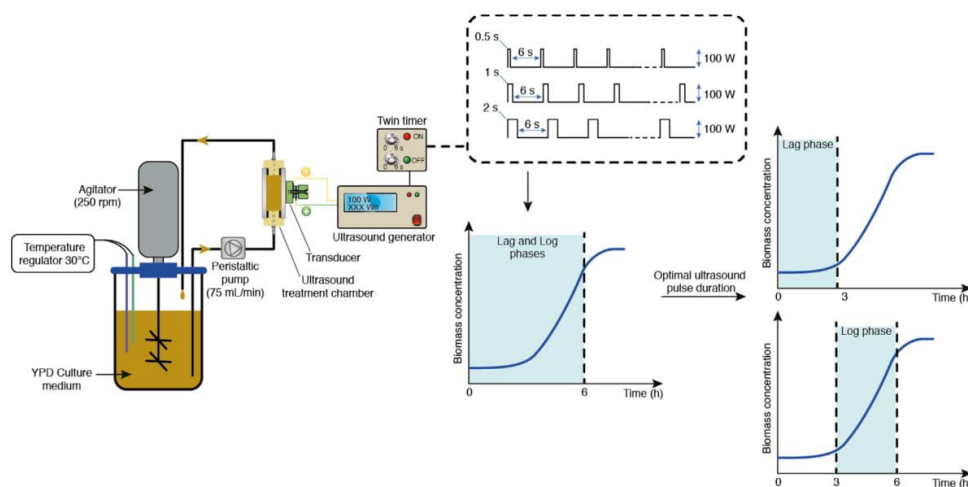


Fig. 2. Experimental set-up for the optimization of US-assisted fermentation of *Hanseniaspora* sp. on YPD medium.

available electrical voltage line into high-frequency waves. A peristaltic pump allowed the medium circulation from the reactor to the treatment chamber and back into the reactor. Various circulation flow rates were tested (25, 50, and 75 mL·min<sup>-1</sup>) without US application to get the same growth and glucose consumption kinetics obtained in batch mode without circulation (Fig. 1A). The total length of the tubes used was equal to 90 cm. The treatment chamber and the tubes were sterilized as above-mentioned.

**2.2.2.2. US-assisted fermentations.** The designed treatment chamber (Fig. 1B) was used for the stimulation of *Hanseniaspora* sp. yeast. The stimulation conditions were first optimized using the synthetic medium. The US treatment was done in a cyclic mode with variable periods of US pulses of  $\Delta t_p = 0.5, 1,$  and  $2$  s, followed by pauses of  $\Delta t_w = 6$  s (Fig. 2). The variation of US application period allowed the optimization of the treatment. US-assisted fermentation was initially performed during the first 6 h of fermentation (associating both the Lag and the Log phases). It was then performed during either the Lag phase (3 h) or the Log phase (3 h), using the optimal US treatment time found when treating both phases.

### 2.2.3. Fermentations in apple juice

**2.2.3.1. Control fermentations.** The apples were first washed and then used to extract the juice using a fruit juice centrifuge separator (Moulinex, France). A volume of 1.5 L of apple juice was introduced into a 2-L sterile fermenter and inoculated by the pre-culture to get an initial concentration of  $3.0 \times 10^6$  cells·mL<sup>-1</sup>. Cider production was conducted for 100 h in batch mode, with medium circulation at 30 °C temperature and 250 rpm agitation speed. The flow rate used for the circulation was fixed to allow obtaining the same growth kinetics compared to the control without medium circulation. The kinetics of growth, substrates consumption, and ethanol production were recorded during the fermentation. The content of soluble compounds was followed by measuring the °Brix using a digital refractometer (Anggur DR401, France).

**2.2.3.2. US-assisted fermentations.** The kinetics of growth, substrate consumption, and ethanol production of US-assisted fermentation were compared to that of control fermentation (Section 2.2.3.1). US-assisted fermentation of apple juice was recorded during the first 12 h of the fermentation (including the Lag phase). The application of US was also performed on the pre-culture for 6 h (including the Lag and Log phases), followed by apple juice fermentation without US treatment

inoculated with the treated pre-culture.

US treatment was done in a pulsed mode with sequential application of  $n$  US pulses. The total time of US cycles was 6 h (21600 s) and can be defined as follows:  $t_t = n(\Delta t_p + \Delta t_w)$ , where  $\Delta t_p$  corresponds to the US pulse duration ( $\Delta t_p = 0.5, 1,$  and  $2$  s), and  $\Delta t_w$  is the pause duration ( $\Delta t_w = 6$  s). The number of pulses was  $n = 21600/(\Delta t_p + \Delta t_w) = 2700, 3086$  and  $3324$ , while the effective time of US treatment was  $t_{US} = n \cdot \Delta t_p$  corresponding to 1662 s, 3086 s, and 5400 s.

The US generator allowed recording the energy  $E$  (Wh) during the treatment. The specific energy consumption  $W$  (J·mL<sup>-1</sup>) was estimated according to equation (1):

$$W (\text{J} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{E * 3600}{V} \quad (1)$$

where  $E$  is the energy (Wh) provided by the generator, and  $V$  is the volume of the culture medium in the bioreactor (mL).

### 2.2.4. Kinetics of growth, substrates consumption, and ethanol production

The kinetics of growth, substrates consumption, and ethanol production were recorded for all the fermentation processes (control and assisted by US).

**2.2.4.1. Determination of the growth kinetics.** The growth kinetics were followed by both measuring the optical density (absorbance) at 600 nm, and counting the cell number (cells·mL<sup>-1</sup>). Samples were taken periodically from the bioreactor and their absorbance values were determined using a Thermo Spectronic BioMate 3 UV-visible spectrophotometer (Thermo Scientific, France). The samples were diluted several times in water, and the cells were counted using a Thoma cell counting chamber (Preciss, France). To detect the viable cells, the samples were mixed with a 0.01% v/v solution of methylene blue. The optical density was followed only for the fermentation in the synthetic medium, while for the apple juice fermentations the biomass concentration was just recorded by cell counting. The biomass concentration  $X$  (cells·mL<sup>-1</sup>) was calculated according to Eq. (2):

$$X (\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{a \cdot 250000 \cdot d}{b} \quad (2)$$

where  $a$  is the number of cells counted,  $d$  is the dilution factor,  $b$  is the number of squares counted in the chamber, and 250000 corresponds to a constant included in the formula of the Thoma cell.

The maximal specific growth rate  $\mu_{max}$  (h<sup>-1</sup>) was determined by plotting  $\ln X$  (cells·mL<sup>-1</sup>) versus time (h). The  $\mu_{max}$  (h<sup>-1</sup>) values



corresponded to the slopes of the linear curves obtained during the exponential phase.

**2.2.4.2. Carbon substrates quantification.** The carbon substrates were quantified enzymatically using a glucose and fructose assay kit (LTA, Milano, Italy).

**2.2.4.3. Ethanol quantification.** The samples taken at different times of the fermentation processes were centrifuged at 6000 rpm for 10 min to eliminate the yeast suspensions and apple particles. The ethanol content was determined by density measurements using a 5-mL glass pycnometer (Thermo Fisher, France). Calibration curve for ethanol quantification was performed using reconstituted solutions of apple juice/ethanol (1–10%, v/v).

The ethanol production rate  $\gamma$  ( $g_{\text{ethanol}} \cdot g_{\text{biomass}}^{-1} \cdot h^{-1}$ ), the biomass yield  $Y_{X/S}$  ( $g_{\text{biomass}} \cdot g_{\text{substrate}}^{-1}$ ), and the product yield ( $Y_{P/S}$  ( $g_{\text{ethanol}} \cdot g_{\text{substrate}}^{-1}$ )) were calculated according to Eqs. (3), (4), and (5), respectively.

$$Y_{X/S} (g_{\text{biomass}} \cdot g_{\text{substrate}}^{-1}) = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3)$$

$$Y_{P/S} (g_{\text{ethanol}} \cdot g_{\text{substrate}}^{-1}) = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (4)$$

$$\gamma (g_{\text{ethanol}} \cdot g_{\text{biomass}}^{-1} \cdot h^{-1}) = \frac{P_f - P_0}{X(t_f - t_0)} \quad (5)$$

where  $X_0$  and  $X_f$  are respectively the initial and the final biomass concentrations,  $P_0$  and  $P_f$  are respectively the initial and the final ethanol concentrations, and  $S_0$  and  $S_f$  are respectively the initial and the final substrate concentrations.

#### 2.2.5. Statistical analyses

Each experiment was repeated three times. One-way ANOVA was used for the statistical analysis of the data with the help of Statgraphics Plus software (version 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). A significance level of 5% was taken for each analysis. The error bars presented in the figures correspond to the standard deviations.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of the experimental parameters

##### 3.1.1. Treatment during the first 6 hours of fermentation

A medium circulation flow rate of  $75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  allowed obtaining the similar growth kinetics than that of the control fermentation without circulation. It was thereby used for US-assisted fermentations. The US parameters were optimized on the synthetic medium by applying US, first during both Lag (adaptation) and Log (exponential) growth phases (6 h), and then separately during either the Lag phase (3 h) or the Log phase (3 h). Results in Fig. 3 show an increase of the biomass (yeast) concentration with US treatment during both Lag and Log phases (6 h). The biomass concentration increased more rapidly under the US treatment than for the control samples, especially for the pulses duration  $\Delta t_p = 0.5$  and  $1 \text{ s}$ , which corresponded to respectively 1662 and 3086 s of effective US treatment. The stimulation effect was more pronounced when applying US pulses for 0.5 s compared to that for pulses of 1 s. Furthermore, increasing the pulse time up to 2 s (effective US treatment of 5400 s) seemed to decrease the yeast growth (Fig. 3). The results of the US treatment of *Hanseniaspora* sp. cells concur with those reported in the literature showing that cell stimulation is energy-dependent, and the application of high energy can lead to a cell growth reduction and yeast inactivation [23].

Treating the cell suspension for 6 h (pulses of 0.5 s followed each by a pause of 6 s) allowed obtaining a significant increase in the final biomass concentration (after 8 h of fermentation) by 63%, which

corresponded to an increase in the number of cells from  $9.0 \cdot 10^7$  (for the control (untreated) medium) to  $1.5 \cdot 10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  (for the US-treated medium). These results concur with the measurements of the optical densities (absorbance values at 600 nm), which showed a significant increase after 8 h of fermentation (from 2.43 for the control experiment to 2.97 for the US-assisted fermentation) (Fig. 3.B). Moreover, the highest specific growth rates  $\mu_{\text{max}}$  of 0.54 and  $0.56 \text{ h}^{-1}$  were observed for the US-assisted fermentations with pulses of 0.5 s and 1 s, respectively, with no significant differences between both growth rates (Table 1). These results concur with those of Barukčić and co-workers, who reported an intensification of the cell growth by  $\approx 1$  log cycle following US treatment, which led to a decrease in the fermentation time [32]. Besides, stimulation of probiotics in milk was reported for the cultures exposed to low-frequency US [19,33]. Ewe and co-workers noted as well an increase up to 9% of the US-treated cells compared to that of the control during the fermentation of biotin-soymilk [34].

Fig. 3C and D present respectively the evolution of glucose concentrations and °Brix values for the US-treated and untreated fermentations. The results show that the values of the °Brix concur with that of glucose concentrations. Both significantly depleted faster for the 6 h US-treated cultures, compared to the untreated ones, with the fastest glucose depletion achieved with the US pulse duration of  $\Delta t_p = 0.5 \text{ s}$ . Likewise, after 8 h of fermentation, the °Brix decreased from 5.9% ( $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) for the untreated culture to 4.8% ( $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) for the US-assisted fermentation (with  $\Delta t_p = 0.5 \text{ s}$ ). Accordingly, the biomass yields per gram of glucose consumed were significantly higher for the US-treated cultures (pulses of 0.5 and 1 s), compared to that of the control fermentation (Table 1). It has been reported in the literature that US may increase the permeability of the cell membrane through the micro-bubbles activity, creating temporary pores on the cell membrane [35]. Furthermore, the formation of reversible pores could improve the transmembrane flow and thereby decreasing the membrane resistance [36] and accelerating the transfer of substrates, which leads to stimulating the cell growth [14,22].

##### 3.1.2. Treatment during either Lag or Log phase

For the suspensions treated during the first 3 h (Lag phase), an increase in the yeast biomass concentration by 43% was observed after 8 h of fermentation (Fig. 4A). However, only an increase of 17% of yeast stimulation was recorded for the cells treated during the Log phase (from 3 to 6 h of fermentation). Additionally, faster sugar depletion was noticed during the Lag phase, compared to the Log phase (Fig. 4C). It was also confirmed by a faster reduction of the °Brix for the treatment during the Lag phase (Fig. 4D). This observation was previously reported by Lanchun and co-workers, who mentioned that the effects of US on the growth of *S. cerevisiae* were significant during the Lag and the Log phases, but not during the stationary phase [22]. They also noted that the yeast cells were less resistant to environmental stress during the Lag phase, preparing for cell growth and reproduction [22].

##### 3.1.3. Energy consumption

Regarding the energy consumption, the US treatment performed during 6 h with pulse duration of 2 s consumed the highest energy ( $269 \text{ J} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), and led to a growth kinetics decrease compared to the US treatments with pulses of 0.5 s and 1 s (Table 1), which consumed less amount of energy (respectively 155 and  $197 \text{ J} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). The same amount of energy ( $77 \text{ J} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was consumed for the US treatments during one growth phase (either Lag or Log); however, different impacts on the growth kinetics were observed.

Thus, the most effective parameters for *Hanseniaspora* sp. cells stimulation, among those tested during this study, could be the application of 0.5 s US pulses followed by 6 s rest period during either both Lag and Log phases or the Lag phase alone.

### 3. Résultats et discussions

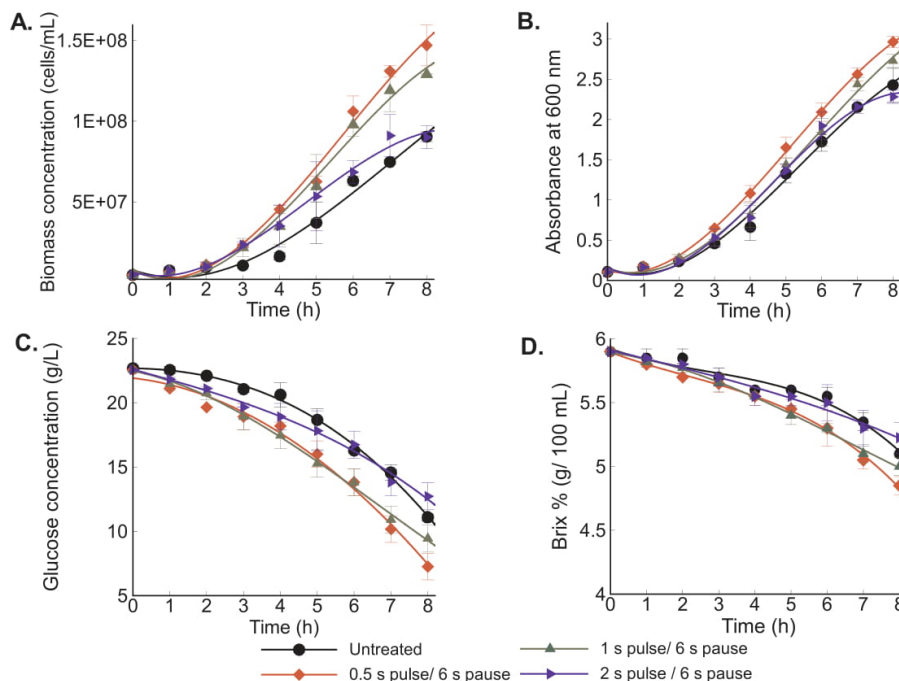


Fig. 3. A. Growth kinetics, B. Optical densities at 600 nm, C. Glucose consumption kinetics, and D. Soluble compounds (“Brix”) depletion kinetics for the control and the US-assisted fermentations with US treatment during the first 6 h (both Lag and Log phases). 0.5 s pulse/6 s pause denotes applying US pulses of 0.5 s followed by a pause period of 6 s.

Table 1

Energy consumptions, and fermentation process performances ( $Y_{(g \text{ biomass} \cdot g \text{ glucose}^{-1})}$ ,  $\mu_{max}$ ) during US treatment. 0.5 s pulse/6 s pause denotes applying US pulses of 0.5 s followed by a pause period of 6 s.

	$W \text{ (J.ml.)}^{-1}$	$\mu_{max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Y_{(g \text{ biomass} \cdot g \text{ glucose}^{-1})}$
Untreated	–	$0.39 \pm 0.004$	$0.08 \pm 0.003$
US treatment during both Lag and Log phases (6 h)			
0.5 s pulse/6 s pause	$155 \pm 3$	$0.54 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.002$
1 s pulse/6 s pause	$197 \pm 5$	$0.56 \pm 0.003$	$0.14 \pm 0.001$
2 s pulse/6 s pause	$269 \pm 7$	$0.43 \pm 0.002$	$0.12 \pm 0.003$
US treatment (0.5 pulse/6 s pause) during either Lag or Log phases (3 h)			
Lag phase treated	$79 \pm 1.5$	$0.50 \pm 0.005$	$0.12 \pm 0.002$
Log phase treated	$77 \pm 1.4$	$0.48 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.004$

#### 3.2. US-assisted fermentation of apple juice

The impact of US on ethanol accumulation during cider production was evaluated using *Hanseniaspora* sp. yeast. An US treatment with pulse duration of 0.5 s followed by a pause of 6 s was applied to either the pre-culture (YPD medium) or the apple juice yeast medium. The growth phase durations of *Hanseniaspora* sp. on apple juice were determined during the conventional fermentation of the apple juice (without US treatment, with or without medium circulation).

##### 3.2.1. Biomass growth kinetics

Results in Fig. 5.A show an increase in the biomass concentration by  $\approx 52\%$  when the apple juice yeast suspension was treated by US during the first 12 h of fermentation (without treating the pre-culture). On the other hand, the biomass concentration increased by 42% when the pre-culture was treated by US, followed by apple juice fermentation without any treatment (Fig. 5.A). The raise in the biomass concentration could be assigned to the stimulation of the yeast cells’ division during the US treatment. Different impacts of US have been reported at

the cellular and molecular level. US could promote microbial growth by separating the cell groups, increasing thereby the membrane permeability and impacting the cellular functions and components [14]. The values of the maximal growth rate,  $\mu_{max}$  (Table 2) showed accelerated growth kinetics by 10 folds for the US-assisted fermentation. As a result, the stationary phase was reached faster. These results concur with that of the literature, where higher  $\mu_{max}$  values were reported for *Lactobacillus sakei* cells treated with US [37].

Moreover, the treatment of the pre-culture showed a significant effect on the fermentation kinetics. A higher  $\mu_{max}$  value was obtained compared to the control, which indicates that the stress of the yeasts during the pre-culture may influence later the fermentation kinetics of apple juice. These results concur with the results of Matsuura and co-workers, who observed a reduction of the fermentation time by 50% when using US ( $30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 43 kHz) [21]. Besides, an increase in the biomass production was reported for *Kluyveromyces marxianus* fermentation treated by 20 kHz sonication at an intensity of  $11.8 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  for a duty cycle less than 20% (a 10% duty cycle: 1 s of sonication followed by a pause of 10 s) [38]. Furthermore, when the fermentation

### 3. Résultats et discussions

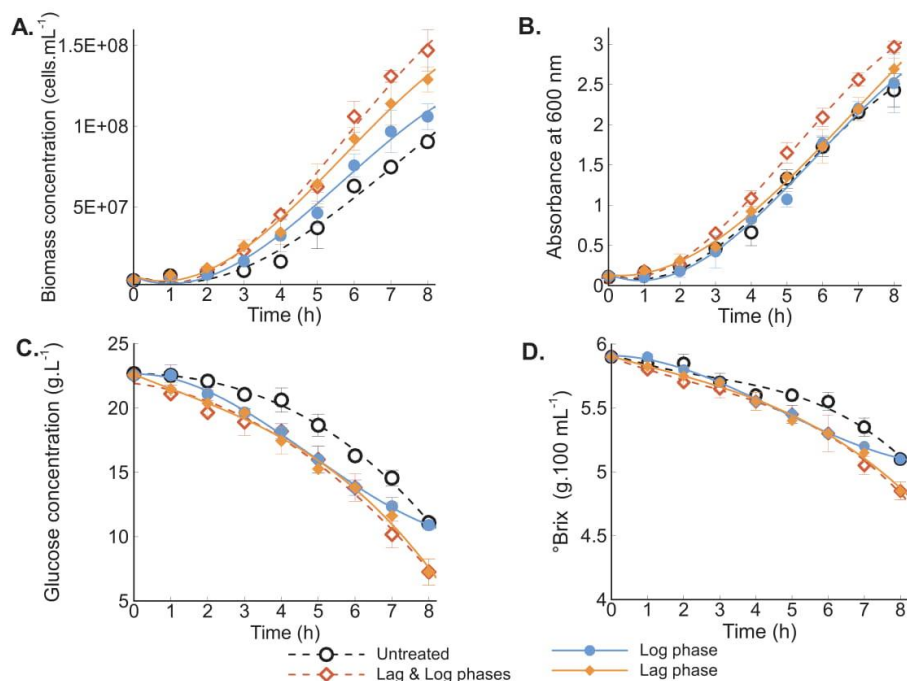


Fig. 4. A. Growth kinetics, B. Optical density measurements at 600 nm, C. Glucose consumption, and D. Soluble compounds depletion kinetics, for the control and the US-assisted fermentations, during the Lag (0–3 h of fermentation) and the Log (3–6 h of fermentation) phases separately, and during both phases (0–6 h of fermentation) treated with pulse duration of 0.5 s, followed by pause of 6 s.

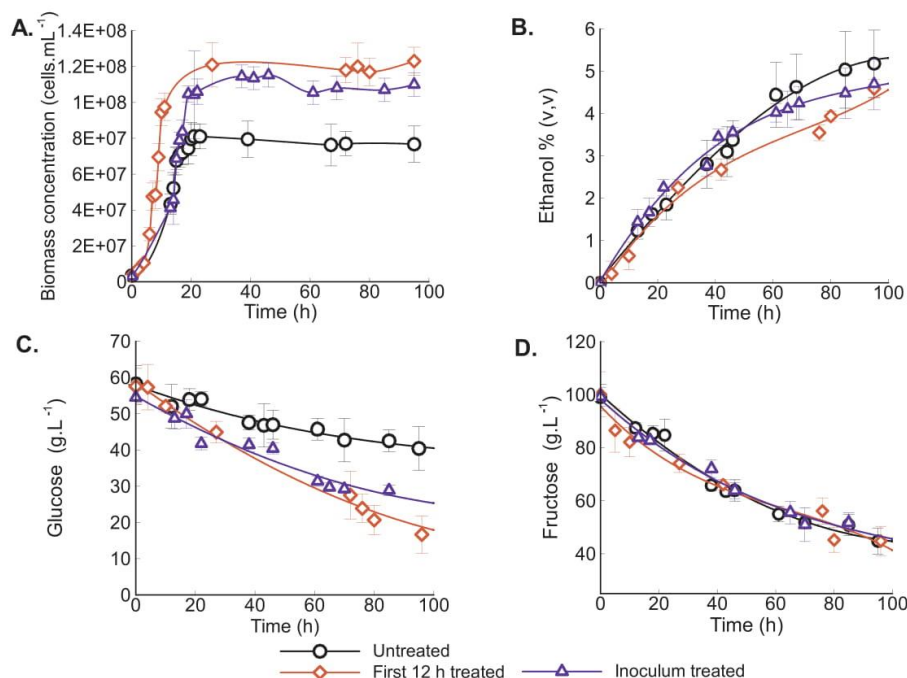


Fig. 5. A. Growth kinetics, B. Ethanol production kinetics, C. Glucose consumption kinetics, and D. Fructose consumption kinetics for the control and the US-assisted fermentations (pulses of 0.5 s followed each by a pause of 6 s).



**Table 2**  
Fermentation process performances, and energy consumptions for the control and US-assisted fermentations.

	$W$ (J.mL <sup>-1</sup> )	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y$ (g biomass . g glucose) <sup>-1</sup>	$Y$ (g biomass . g fructose) <sup>-1</sup>	$Y$ (g ethanol . g glucose) <sup>-1</sup>	$Y$ (g ethanol . g fructose) <sup>-1</sup>	$\gamma_{max}$ (g ethanol . g biomass.h <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>
Untreated	–	0.03 ± 0.002	0.04 ± 0.001	0.01 ± 0.002	0.27 ± 0.007	0.07 ± 0.001	0.30 ± 0.01
First 12 h treated	311.4 ± 4.56	0.32 ± 0.05	0.05 ± 0.002	0.03 ± 0.001	0.07 ± 0.002	0.06 ± 0.002	0.15 ± 0.003
Inoculum treated	158.2 ± 3.2	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.13 ± 0.002	0.07 ± 0.002	0.28 ± 0.004

was treated during the Lag phase, a 1 h reduction of the Lag phase was observed by Jomdecha & Prateepasen [23]. Finally, an ultrasonic treatment of 1 s after intermitting for 15 s during 30 min can stimulate the growth of *S. cerevisiae* by around 33.3%, and then the stationary phase was reached 4 h earlier compared to that of the control [22,39]. Besides, Yang et al. have reported that US treatment enhanced the growth of *Brevibacterium* sp. [40].

### 3.2.2. Ethanol production and sugar consumption kinetics

In terms of ethanol production, results in Fig. 5.B show a decrease in the ethanol concentration by 0.41 and 0.55%, respectively for the treated pre-culture for 6 h, and the treated juice during the first 12 h, compared to the control. Besides, a decrease in the specific ethanol production rate  $\gamma_{max}$  was observed in comparison with the control (Table 2). Fig. 5C and D show an increase in glucose consumption while the same quantity of fructose was used for the control and US-assisted fermentations. This result is also reflected by the yield values, showing that the ethanol yield production per gram of fructose was constant for all the fermentation processes, whereas the ethanol yield per gram of glucose decreased for the US-assisted fermentations (Table 2).

These results could be explained by the fact that the fastest biomass kinetic (juice treated by US during the first 12 h) could be associated with the lowest ethanol content (reduction of 0.55% (v/v) and ethanol production rate, and with the highest glucose consumption. The yeast cells seem to consume more glucose to produce more biomass and CO<sub>2</sub> rather than producing ethanol. In fact, it was reported that one of the probable impacts of the US is improving the substrate consumption and oxygen uptake leading to a higher cell biomass concentration [14,41,42]. Some studies have also reported that US may enhance the enzyme activity [20,33,41,43]. In fact, applying US causes a strong micro-convection in the medium, which may increase the mass transfer of substrates through the cell membrane, and alters the enzyme conformation and the enzyme-substrate affinity [7]. Since higher concentration of substrate is accessible by cells, associated enzyme activities may be promoted, leading to higher glucose consumption and thereby higher biomass production. A thorough study of enzymes' kinetics could be of great interest for a better understanding of microbial stimulation by US.

It is important to note that different impacts of US on fermentation have been reported in the literature depending on the intensity, the duration of the treatment, and the type of microorganism being treated [44,45]. A recent study demonstrated a decrease in ethanol production for the fermentations assisted by US [26]. A direct US treatment at 23 and 32 W.L<sup>-1</sup>, or an indirect US (1.4 W.L<sup>-1</sup>) treatment had undesirable effects on *S. cerevisiae* activity and viability and induced a reduction in glucose consumption rates and ethanol production [26]. Ojha and co-workers studied the impact of US on *L. sakei*, and revealed that several metabolic pathways were affected by US [37]. Results also showed that the US-treated *L. sakei* had significant variations in nutrient consumption. The ultrasonicated cells preferred to consume other carbon sources in comparison with the untreated cells. These results may explain the enhancement in the glucose uptake for the US-treated cells in the current study (Fig. 5C). The metabolic pathway of *Hanseniaspora* sp. treated cells may be redirected to produce more biomass than to produce ethanol. Thus, the results obtained in the current study may highlight that US treatment of *Hanseniaspora* sp. cells could be a promising way to reduce the ethanol content in alcoholic beverages and to

control the sugar/ethanol conversion rate. Particularly, US is classified as a technology that preserves the qualitative characteristics of the treated products, such as flavor, odor, and visual appearance. However, different disadvantages were reported in some studies affecting the final product's texture [46]. In the current study, organoleptic analyses are required in order to evaluate the volatile organic compounds and the aromatic profile of the untreated and US-treated ciders.

## 4. Conclusions

In this work, the effects of US treatment on *Hanseniaspora* sp. yeast cells were first studied and optimized using synthetic medium. For an effective treatment time of 1662 s, applied during both the Lag and Log phases (6 h) for pulse duration of 0.5 s followed by 6 s pause, the yeast concentration and the biomass yield increased significantly. The depletion of glucose was also significantly faster. For this short period of US exposure, the cells were more sensitive to the treatment during the Lag phase rather than during the Log phase. The yeast concentration and the biomass yield increased significantly during the Lag phase.

Afterward, the impact of US treatment on *Hanseniaspora* sp. cells was studied during the apple juice fermentation. The yeast concentration and the biomass yield increased significantly when the cells were treated during the first 12 h of the fermentation. Besides, the ethanol content was reduced by 0.55% (v/v) and the biomass production rate was 10 folds higher than the control. Furthermore, the yeast concentration and the biomass yield increased significantly for the US-treated cells.

The obtained results demonstrate the potential for the practical implementation of the US fermentation technology to reduce the ethanol content during the fermentation processes and especially using *Hanseniaspora* sp. yeast cells. Nevertheless, further investigations are required to understand the mechanisms behind microbial stimulation and ethanol reduction.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgment

The authors wish to thank the Research council of Saint-Joseph University of Beirut, Project FS103 and the Lebanese National Council for Scientific research (CNRS-FS129).

### References

- [1] Y. Chisti, Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity, Trends Biotechnol. 21 (2003) 89–93.
- [2] Y. Zhao, W.T. Ang, J. Xing, J. Zhang, J. Chen, Applications of ultrasound to enhance mycophenolic acid production, Ultrason. Med. Biol. 38 (2012) 1582–1588.
- [3] K.G. Zinoviadou, C.M. Galanakis, M. Brnčić, N. Grimi, N. Boussetta, M.J. Mota, J.A. Saraiva, A. Patras, B. Tiwari, F.J. Barba, Fruit juice sonication: implications on food safety and physicochemical and nutritional properties, Food Res. Int. 77 (Part 4) (2015) 743–752.
- [4] F. Chemat, N. Rombaut, A. Meullemiestre, M. Turk, S. Perino, A.-S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian, Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 41 (2017) 357–377.
- [5] F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier,

- M. Abert-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrason. Sonochem.* 34 (2017) 540–560.
- [6] P.R. Gogate, A.M. Khabadi, A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology, *Biochem. Eng. J.* 44 (2009) 60–72.
- [7] J.P. Pagnossa, G. Rocchetti, A.C. Ribeiro, R.H. Piccoli, L. Lucini, Ultrasound: beneficial biotechnological aspects on microorganisms-mediated processes, *Curr. Opin. Food Sci.* 31 (2020) 24–30.
- [8] N. Sainz Herrán, J.L. Casas López, J.A. Sánchez Pérez, Y. Chisti, Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 593–600.
- [9] H. Hu, Y. Yonezawa, A. Matsuda, N. Ishida, A. Noguchi, Influences of ultrasound and Ohmic heating on growth of Sake yeast, *Food Sci. Technol. Res.* 18 (2012) 611–616.
- [10] C. Dai, F. Xiong, R. He, W. Zhang, H. Ma, Effects of low-intensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, *Ultrason. Sonochem.* 36 (2017) 191–197.
- [11] T.S. Awad, H.A. Moharram, O.E. Shaltout, D. Asker, M.M. Youssef, Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review, *Food Res. Int.* 48 (2012) 410–427.
- [12] B. Kwiatkowska, J. Bennett, J. Akunna, G.M. Walker, D.H. Bremner, Stimulation of bioprocesses by ultrasound, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 768–780.
- [13] K.S. Ojha, T.J. Mason, C.P. O'Donnell, J.P. Kerry, B.K. Tiwari, Ultrasound technology for food fermentation applications, *Ultrason. Sonochem.* 34 (2017) 410–417.
- [14] G. Huang, S. Chen, C. Dai, L. Sun, W. Sun, Y. Tang, F. Xiong, R. He, H. Ma, Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity, *Ultrason. Sonochem.* 37 (2017) 144–149.
- [15] H. Ma, L. Huang, J. Jia, R. He, L. Luo, W. Zhu, Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 419–424.
- [16] W. FeiFei, C. Ling, L. HuaQiang, Z. LiangZhong, X. YongPing, L. YanZhen, C. Qiong, Z. ZaoMing, Research progress of applications of ultrasonic technology in food industry, *J. Food Saf. Qual.* 8 (2017) 2670–2677.
- [17] A.S. Polonorum, J. Stadnik, D. Stasiak, Applications of ultrasound in food technology, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 6 (2007) 89–99.
- [18] A. Vercet, R. Oria, P. Marquina, S. Crelier, P. Lopez-Buesa, Rheological properties of yoghurt made with milk submitted to manothermosonication, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6165–6171.
- [19] T.M.P. Nguyen, Y.K. Lee, W. Zhou, Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by highintensity ultrasound, *Int. Dairy J.* 19 (2009) 410–416.
- [20] S.-K. Yeo, M.-T. Liong, Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 885–897.
- [21] K. Matsuura, M. Hirotsune, Y. Nunokawa, M. Satoh, K. Honda, Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation, *J. Ferment. Bioeng.* 77 (1994) 36–40.
- [22] S. Lanchun, W. Bochu, L. Zhiming, D. Chuanren, D. Chuanyun, A. Sakanishi, The research into the influence of low-intensity ultrasonic on the growth of *S. cerevisiae*, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 30 (2003) 43–49.
- [23] C. Jomdecha, A. Prateepasen, Effects of pulse ultrasonic irradiation on the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* growth, *Lett. Appl. Microbiol.* 52 (2011) 62–69.
- [24] O. Schläfer, M. Sievers, H. Klotzbücher, T.I. Onyeché, Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors, *Ultrasonics* 38 (2000) 711–716.
- [25] S. Singh, M. Agarwal, S. Sarma, A. Goyal, V.S. Moholkar, Mechanistic insight into ultrasound induced enhancement of simultaneous saccharification and fermentation of *Parthenium hysterophorus* for ethanol production, *Ultrason. Sonochem.* 26 (2015) 249–256.
- [26] L. Huez, A. Shah, F.C. Michel Jr., Effects of ultrasound on fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Fermentation* 5 (2019) 16, <https://doi.org/10.3390/fermentation5010016>.
- [27] B.S. Valles, R.P. Bedriñana, N.F. Tascón, A.Q. Simón, R.R. Madrera, Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider, *Food Microbiol.* 24 (2007) 25–31.
- [28] R. Pando Bedriñana, A. Querol Simón, B. Suárez Valles, Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias, *Food Microbiol.* 27 (2010) 503–508.
- [29] V. Capozzi, C. Berbegal, M. Tufariello, F. Grieco, G. Spano, F. Grieco, Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations, *LWT* 109 (2019) 241–249.
- [30] G. de Arruda Moura, C.M.E. dos Pietrowski, E. Santos, G. Sauer, A. Nogueira Wosiacki, Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9815–9821.
- [31] M. Al Daccache, D. Salameh, R. Maroun, N. Louka, New indigenous yeast strains “*Hanseniaspora Meyeri-Libani*” for the elaboration of cider”, Patent number: 12017/10-11265L, Lebanon, 2017.
- [32] I. Barukčić, K. Lisak Jakopović, Z. Herceg, S. Karlović, R. Božanić, Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27 (2015) 94–101.
- [33] T.M.P. Nguyen, Y.K. Lee, W. Zhou, Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation, *Food Chem.* 130 (2012) 866–874.
- [34] J.-A. Ewe, W.-N. Wan-Abdullah, A.K. Alias, M.-T. Liong, Effects of ultrasound on growth, bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent and subsequent passages of *Lactobacillus fermentum* BT 8633 in biotin-supplemented soymilk, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 890–900.
- [35] R. Bekeredjian, C. Bohris, A. Hansen, H.A. Katus, H.F. Kuecherer, S.E. Hardt, Impact of microbubbles on shock wave-mediated DNA uptake in cells in vitro, *Ultrason. Sonochem.* 33 (2007) 743–750.
- [36] C.X. Deng, F. Sieling, H. Pan, J. Cui, Ultrasound-induced cell membrane porosity, *Ultrason. Sonochem.* 30 (2004) 519–526.
- [37] K.S. Ojha, C.M. Burgess, G. Duffy, J.P. Kerry, B.K. Tiwari, Integrated phenotypic-genotypic approach to understand the influence of ultrasound on metabolic response of *Lactobacillus sakei*, e0191053, *PLoS One* 13 (2018), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191053>.
- [38] A.Z. Sulaiman, A. Ajit, R.M. Yunus, Y. Chisti, Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity, *Biochem. Eng. J.* 54 (2011) 141–150.
- [39] S. Lanchun, W. Bochu, Z. Liancai, L. Jie, Y. Yanhong, D. Chuanren, The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 30 (2003) 61–66.
- [40] S. Yang, H. Zhang, W. Wang, The ultrasonic effect on the mechanism of cholesterol oxidase production by *Brevibacterium* sp, *Afr. J. Biotechnol.* 9 (2010) 2574–2578.
- [41] D.N. Avhad, V.K. Rathod, Ultrasound assisted production of a fibrinolytic enzyme in a bioreactor, *Ultrason. Sonochem.* 22 (2015) 257–264.
- [42] W. Bochu, S. Lanchun, Z. Jing, Y. Yuanyuan, Y. Yanhong, The influence of Ca<sup>2+</sup> on the proliferation of *S. cerevisiae* and low ultrasonic on the concentration of Ca<sup>2+</sup> in the *S. cerevisiae* cells, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 32 (2003) 35–42.
- [43] A. Guiseppe-Elie, S.-H. Choi, K.E. Geckeler, Ultrasonic processing of enzymes: effect on enzymatic activity of glucose oxidase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 58 (2009) 118–123.
- [44] L. Galván-D'Alessandro, R.A. Carcioci, Fermentation assisted by pulsed electric field and ultrasound: a review, *Fermentation* 4 (2018), <https://doi.org/10.3390/fermentation4010001>.
- [45] M. Moncada, K.J. Aryana, C. Boenke, Effect of mild sonication conditions on the attributes of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12, *Adv. Microbiol.* 2 (2012) 720–726.
- [46] I.S. Arvanitoyannis, K.V. Kotsanopoulos, A.G. Savva, Use of ultrasounds in the food industry-Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics of foods: A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (2017) 109–128.



---

## 4. Conclusion générale et perspectives

---

### 4.1. Conclusion générale

Ce travail de thèse a porté sur l'étude du potentiel fermentaire des pommes libanaises et l'impact des technologies émergentes de CEP et d'US sur la fermentation. La synthèse bibliographique a soulignée et décrit le procédé fermentaire, l'impact et l'importance des levures sur la fermentation, ainsi que les différents effets des CEP et des US sur cette fermentation. Nous avons aussi remarqué le manque d'informations disponibles sur les pommes libanaises et leurs valorisations, surtout pour l'élaboration du cidre. Ainsi, les travaux de cette thèse se sont focalisés sur l'étape de la fermentation en vue de l'élaboration du cidre, en étudiant les différents éléments ayant un impact majeur sur ce processus : le ferment, la composition des pommes, et l'impact des technologies émergentes de CEP et d'US appliqués à faibles intensités.

Dans ce contexte, les études ont porté d'abord sur l'identification et l'évaluation de la capacité fermentaire d'une souche de levure indigène retrouvée sur la pomme libanaise. Dans ce cadre, deux variétés de pommes ont été choisies. La pomme libanaise de la variété « Ace spur » a été choisie pour nos études, et comparée à la pomme à cidre française « Kermerrien », prise comme témoin. Au cours de cette étude, l'identification génétique a montré que la souche du genre *Hanseniaspora* sp. était responsable de la fermentation spontanée des pommes « Ace spur ». Les différentes fermentations ont montré que la souche pouvait fermenter jusqu'à 4% et 3,5% d'éthanol (v, v) les jus de pomme « Ace spur » et « Kermerrien », respectivement. De plus, la souche isolée a été caractérisé par sa capacité à métaboliser des concentrations élevées en sucre (200 g/L) et elle a présenté un rendement fermentaire pour la production d'éthanol comparable à celui retrouvé dans la littérature. La levure *Hanseniaspora* sp. a présenté une croissance plus rapide et des taux de production d'éthanol plus importants lors de la fermentation du jus de pomme libanais « Ace spur » par rapport à la fermentation des pommes « Kermerrien ». **Nos résultats soulignent ainsi la possibilité d'utiliser cette souche comme agent unique pour la fermentation du jus de pommes en vue de l'élaboration du cidre.**

Ensuite, les caractéristiques physiques et chimiques des pommes ont été étudiées permettant ainsi d'évaluer la capacité de la matière première à la production du cidre. Les propriétés pomologiques, les compositions physicochimiques et les capacités de fermentation des variétés de pommes « Ace spur » et « Kermerrien » ont été évaluées. Les résultats obtenus ont montré que la taille et la forme, ainsi que les compositions chimiques des deux variétés de pommes étaient significativement différentes. La variété « Ace spur » renferme plus de sucre, et en particulier une quantité importante de fructose (193 g/L de sucres totaux en moyenne avec 100 g/L de fructose contre 132 g/L pour la variété « Kermerrien » avec 58 g/L de fructose). Les pommes « Kermerrien » contiennent en revanche plus d'acide malique (15,28 g/L contre 2,93 g/L pour « Ace spur »), et de composés phénoliques (514,13 GAE/ 100 g de matière sèche contre 419,83 GAE/ 100 g de matière sèche pour « Ace spur »). Prenant en compte tous les résultats obtenus dans le cadre de ce travail et malgré les différences en composition trouvées,

#### 4. Conclusion générale et perspectives

---

la variété de pomme libanaise « Ace spur » semble être convenable pour l'élaboration de cidre.

Par la suite, l'impact des technologies émergentes de CEP et d'US a été évalué en suivant les cinétiques de croissance de biomasse, de production d'éthanol, et de consommation de substrats. Le calcul des différents paramètres fermentaires tels que les rendements de formation de biomasse et de production d'éthanol, les vitesses spécifiques de croissance de la biomasse, et de la production d'éthanol a permis de mieux comprendre les changements qui ont lieu au cours des fermentations traitées. Les traitements ont été appliqués en continu grâce à une cellule de traitement conçue spécifiquement pour ces études.

Dans cette optique, les effets de l'électrostimulation par CEP sur les cellules de levure *Hanseniaspora* sp. ont été étudiés dans un milieu synthétique en premier lieu à des intensités situées entre 72 et 285 V/cm. Pour un temps de traitement effectif de 10,716 s, appliqué pendant les phases de latence et exponentielle (les 6 premières heures), la concentration en levure et le rendement en biomasse ont augmenté de manière significative. Le glucose a été notamment consommé plus rapidement. Également, ces études ont permis de conclure que **les cellules de levure étaient plus sensibles au traitement par CEP pendant la phase de latence plutôt que durant la phase exponentielle**. Cependant, **l'impact de stimulation le plus important a été observé pour une application de champ électrique de 285 V/cm appliquée durant les deux phases**.

Dans un deuxième temps, l'impact du traitement par CEP a été étudié lors de la fermentation du jus de pomme. Ainsi, quatre fermentations assistées par CEP ont été étudiées: un traitement durant 12 h à compter du début de la fermentation, y compris la phase de latence, un traitement durant 12 h au cours de la phase exponentielle (après 12 h de fermentation), une fermentation inoculée avec une pré-culture traitée pendant 6 h (durant les phases de latence et exponentielle), et enfin une fermentation traitée durant 12 h de la phase exponentielle (après 12 h de fermentation), qui a été inoculée par une pré-culture préalablement traitée pendant 6 h. **Une stimulation de la croissance des levures et une diminution du taux d'éthanol ont été observées pour toutes les fermentations assistées par CEP**. Une augmentation de la concentration de la biomasse d'environ 25% a été observée lorsque les levures ont été traitées pendant ou après les douze premières heures de fermentation et d'environ 45% lorsque l'inoculum a été préalablement traité. Également, **on note que la réduction d'éthanol la plus importante a été observée pour une durée effective de traitement de 10,716 s appliquée à la pré-culture durant 6 h et la diminution d'éthanol la plus faible (0,5% (v, v)) a été observée pour les fermentations traitées durant la phase exponentielle**.

En outre, nous avons remarqué que les cellules de levure étaient plus sensibles au traitement au cours des premières heures de fermentation que durant la phase exponentielle, bien que la même énergie a été utilisée pour les deux traitements.

Pour faire suite à cette étude, les impacts du traitement par US sur la levure *Hanseniaspora* sp. ont été étudiés. Les paramètres de traitements ont d'abord été optimisés lors de la culture des levures dans un milieu synthétique. Une cellule de traitement en continu munie d'un transducteur générant des US a été conçue spécifiquement pour cette étude. **Pour une durée**

#### 4. Conclusion générale et perspectives

---

**de traitement effectif de 1662 s, appliquée durant les six premières heures de fermentation (phases de latence et exponentielle) avec des impulsions de 0,5 s suivie d'une période de repos de 6 s, la concentration de levure et le rendement en biomasse ont augmenté de manière significative.** La consommation de glucose était également plus rapide. Pendant cette courte période d'exposition aux US, **les cellules étaient plus sensibles au traitement lors de la phase de latence que durant la phase exponentielle.** Nous avons remarqué aussi que la concentration de levure et le rendement en biomasse ont augmenté de manière significative pendant la phase de latence.

Par la suite, l'impact du traitement par US sur les cellules *Hanseniaspora* sp. a été étudié lors de la fermentation du jus de pomme. La concentration en levure et le rendement en biomasse ont augmenté de manière significative. **Une augmentation de la concentration de biomasse d'environ 52% a été observée lorsque les cellules ont été traitées durant les 12 premières heures de la fermentation (sans traiter la pré-culture).** En outre, **la teneur en éthanol a été réduite de 0,55% et le taux de production de biomasse était 10 fois plus élevé que le control.** L'augmentation était de 42% lorsque la pré-culture a été traitée par US, suivie par la fermentation du jus de pomme sans traitement par US.

Enfin, les résultats ont montré le potentiel fermentaire de la souche *Hanseniaspora* sp. sur le jus de pommes libanaises « Ace spur » afin d'élaborer le cidre. Les résultats obtenus ont montré aussi que les technologies de CEP ou d'US appliquées lors de la fermentation pourront réduire/contrôler la teneur en éthanol, en utilisant la levure *Hanseniaspora* sp. pour la fermentation. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes derrière la stimulation microbienne et la réduction du taux d'éthanol.

#### 4.2. Perspectives

Ces travaux ont ouvert de nombreuses pistes pour la poursuite des études sur la souche indigène, les pommes libanaises, ainsi que les éléments agissants sur la fermentation. Ils ont, par conséquent, soulevé de nouvelles perspectives d'investigation. Certaines de ces perspectives sont d'ordre scientifique et d'autres d'ordre technologique ou industriel. Les principales perspectives se trouvent dans la liste suivante :

- Caractérisation plus approfondie de la souche isolée *Hanseniaspora* sp. afin d'identifier son espèce,
- Séquençage complet du génome de la souche isolée afin d'identifier les gènes de transporteurs de sucres et les enzymes intervenant lors de la fermentation,
- Etude de la performance de la levure isolée sous différentes conditions : température, pH, concentrations d'oxygène et de sucres,
- Etude du potentiel œnologique de la souche isolée dans le but d'élaborer des vins diversifiés avec de faible teneur en éthanol,
- Comparaison des cinétiques fermentaires, du profil aromatique de la souche isolée avec une souche référence du genre *Hanseniaspora* et une souche *S.cerevisiae*,
- Comparaison des propriétés physiques (viscosité, couleur, etc) des produits fermentés par la souche isolée, une souche référence du genre *Hanseniaspora* et une souche *S.cerevisiae*,

#### 4. Conclusion générale et perspectives

---

- Etude des fermentations combinées *S.cerevisiae* et la souche indigène *Hanseniaspora* sp. afin d'optimiser la cinétique fermentaire et la qualité du produit fini,
- Optimisation de la composition du jus de pommes et retrouver un mélange ou une variété de pommes plus adapté(e) à la production de cidre. Un sondage pourrait être fait entre différents cidres provenant de différents mélanges de pommes afin de choisir le cidre préféré des consommateurs,
- Etude du profil phénolique des pommes libanaises et du cidre produit,
- Etude de l'électroporation des levures lors du traitement par CEP afin de mieux comprendre le mécanisme stimulant des levures,
- Suivi par marquage du carbone des différents sucres présents lors de la fermentation du jus de pommes sous et sans traitement, afin de mieux comprendre la transformation de ces sucres par les différentes voies métaboliques de la levure,
- « Scale -up » des fermentations du jus de pommes de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle,
- Etude d'autres types de cellules de traitements CEP : géométrie, volume, type d'écoulement, etc.,
- Etude de différentes intensités et puissances de traitement pour la stimulation des levures,
- Application des mêmes paramètres utilisés dans nos travaux sur une autre souche de levure comme *S. cerevisiae* pour mieux comprendre le mécanisme des CEP sur la stimulation des levures,
- Traitement des levures dans un autre milieu que le jus de pommes comme le jus de raisin et étudier l'effet des CEP et des US sur la fermentation en vue de l'élaboration du vin,
- Comparaison de la qualité du produit fermenté sous ou sans traitement (CEP et US) : couleur, profil aromatique, etc.,
- Couplage des deux traitements CEP et US et étude de leur impact sur la fermentation,
- Etude des cinétiques fermentaires des levures déjà traitées par CEP et puis séchées afin d'étudier la mémorisation du stress par la levure qui pourra engendrer des cinétiques plus rapides et une production de faible teneur en éthanol.

---

## Références bibliographiques

---

Agreste Panorama (2017) *En 2017, une évolution contrastée des productions mais un redressement des prix pour la majorité des grandes cultures et des filières animales contrairement aux fruits et légumes.*

Ahmed, F. I. . and Russell, C. (1975) ‘Synergism between ultrasonic waves and hydrogen peroxide in the killing of micro-organisms’, *The Journal of applied bacteriology*, 39, pp. 31–40.

Álvarez, I., Condón, S. and Raso, J. (2006) ‘Microbial inactivation by pulsed electric fields’, in Raso, Javier and Heinz, V. (eds) *Pulsed electric fields technology for the food industry*. Springer US (Food Engineering Series), pp. 97–129.

Amiali, M. *et al.* (2004) ‘Inactivation of *Escherichia Coli* O157:H7 in Liquid Dialyzed Egg Using Pulsed Electric Fields’, *Food and Bioproducts Processing*, 82(2), pp. 151–156.

Anderson, J. M. (1953) ‘Effects of ultrasonic radiation on growth and fermentation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 11, pp. 122–137.

Araújo, O. Q. F. *et al.* (2004) ‘Electrical stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures’, *Brazilian Journal of Microbiology*, pp. 97–103.

Araújo, O. Q. F. *et al.* (2007) ‘Glucose Uptake in Electrically Stimulated Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*’, *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering*, (September), pp. 16–20.

Arroyo-López, F. N. *et al.* (2009) ‘Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid’, *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), pp. 120–127.

Arroyo Casabona, C. *et al.* (2011) ‘Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods’, *International journal of food microbiology*, 144, pp. 446–454.

de Arruda Moura Pietrowski, G. *et al.* (2012) ‘Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple.’, *Journal of agricultural and food chemistry*. United States, 60(39), pp. 9815–9821.

Barba, F. J. *et al.* (2017) ‘Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review’, *Trends in Food Science & Technology*, 66, pp. 20–35.

Barbosa-Cánovas, G. V. *et al.* (1999) *Preservation of foods with pulsed electric fields*. San Diego, Calif.: Academic Press.

Barukčić, I. *et al.* (2015) ‘Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey’, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, pp. 94–101.

Beebe, S. J. and Schoenbach, K. H. (2005) ‘Nanosecond pulsed electric fields: a new stimulus

to activate intracellular signaling.’, *Journal of biomedicine & biotechnology*. Hindawi Publishing Corporation, 2005(4), pp. 297–300.

Beech, F. (1972) ‘Cider Making and Cider Research: a Review’, *Journal of the Institute of Brewing*, 78, pp. 477–491.

Belitz, H. D. and Grosch, W. (2009) *Food Chemistry Berlin Allemagne: Springer Verlag*.

Benito, Á., Calderón, F. and Benito, S. (2019) ‘Mixed alcoholic fermentation of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* and its influence on mannose-containing polysaccharides wine composition’, *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 9(1), p. 17.

Benito, S. (2018) ‘The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking.’, *Applied microbiology and biotechnology*. Germany, 102(16), pp. 6775–6790.

Berovic, M., Potocnik, M. and Strus, J. (2008) ‘The influence of galvanic field on *Saccharomyces cerevisiae* in grape must fermentation’, *Vitis*, 47(2), pp. 117–122.

Blume, T. and Neis, U. (2004) ‘Improved wastewater disinfection by ultrasonic pre-treatment’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(5), pp. 333–336.

Bonora, A. and Mares, D. (1982) ‘A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eukaryotic microorganisms.’, *Current Microbiology*, 7(4), pp. 217–221.

Boudreau, T. F. *et al.* (2018) ‘Free amino nitrogen concentration correlates to total yeast assimilable nitrogen concentration in apple juice’, *Food Science and Nutrition*, 6(1), pp. 119–123.

Bsoul, A. Al *et al.* (2010) ‘Effectiveness of ultrasound for the destruction of *Mycobacterium* sp. strain (6PY1)’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), pp. 106–110.

Bustard, M. *et al.* (1996) ‘The effect of pulse field strength on electric field stimulated biosorption of uranium by *Kluyveromyces marxianus* IMB3’, *Biotechnology Letters*, 18, pp. 479–482.

Capelo, J. *et al.* (2005) ‘Micro-focused ultrasonic solid-liquid extraction ( $\mu$ FUSLE) combined with HPLC and fluorescence detection for PAHs determination in sediments: Optimization and linking with the analytical minimalism concept’, *Talanta*, 66, pp. 1272–1280.

Carlsen, N. (1991) ‘Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker’s yeast’, *Journal of gene*, 137(12), pp. 2879–2883.

Castro, I. *et al.* (2005) ‘The effect of the electric field on lag-phase, ethanol and  $\beta$ -galactosidase production of a recombinant *S. cerevisiae* growing on lactose’, in. Rio de Janeiro, Brazil.

Castro, I. D. M., Teixeira, J. A. and Vicente, A. A. (2005) ‘The effect of the electric field on lag-phase, ethanol and  $\beta$ -galactosidase production of a recombinant *S. cerevisiae* growing on lactose.’, *2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering.*, (January).



- Chang, D. C. *et al.* (1992) 'Overview of electroporation and electrofusion', in Chang, D. C. *et al.* (eds) *Guide to Electroporation and Electrofusion*. San Diego: Academic Press, pp. 1–6.
- Charoenghai, C., H.Fleet, G. and Henschke, P. A. (1998) 'Effects of Temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts', *Am. J. Enol. Vitic.*, 49(3), pp. 1–6.
- Chemat, F., Zill-e-Huma and Khan, M. K. (2011) 'Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction', *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), pp. 813–835.
- Chilver, M. J., Harrison, J. and Webb, T. J. B. (1978) 'Use of immunofluorescence and viability stains in quality control', *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. Taylor & Francis, 36(1), pp. 13–18.
- Chinnici, F. *et al.* (2004) 'Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), pp. 4684–4689.
- Choi, E. J. *et al.* (2015) 'Effect of ultrasonication on fermentation kinetics of beer using six-row barley cultivated in Korea', *Journal of the Institute of Brewing*, 121(4), pp. 510–517.
- Ciani, M. *et al.* (2016) 'Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines.', *Frontiers in microbiology*. Switzerland, 7, p. 642.
- Ciani, M. and Maccarelli, F. (1998) 'Oenological properties of non- *Saccharomyces* yeasts associated with wine-making', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), pp. 199–203.
- Ciccolini, L. *et al.* (1997) 'Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: Effect of temperature and of ultrasonic power', *Chemical Engineering Journal*, 65(2), pp. 145–149.
- Ciftci, T., Constantinides, A. and Wang, S. S. (1983) 'Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation.', *Biotechnology and bioengineering*. United States, 25(8), pp. 2007–2023.
- Clemente-Jimenez, J. M. *et al.* (2004) 'Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must', *Food Microbiology*, 21(2), pp. 149–155.
- Cleveland, R. O. and Mcateer, J. A. (2012) 'Extracorporeal shock wave lithotripsy: the physics of shock wave lithotripsy.', in Decker, B. C. (ed.) *Smith's Textbook on Endourology*.
- Combina, M. *et al.* (2005) 'Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina', *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), pp. 237–243.
- Concetta Compagno, Sofia Dahko, J. P. (2014) 'Introduction to carbon metabolism in yeast', in *Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism*. Springer Heidelberg New York

Dordrecht London.

Contreras, A. *et al.* (2014) 'Evaluation of non- *Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine', *Applied and environmental microbiology*. 2013/12/27. American Society for Microbiology, 80(5), pp. 1670–1678.

Crabtree, H. G. (1929) 'Observations on the carbohydrate metabolism of tumours.', *The Biochemical journal*, 23(3), pp. 536–45.

Crouzier, D. *et al.* (2009) 'Pulsed electromagnetic field at 9.71GHz increase free radical production in yeast ( *Saccharomyces cerevisiae* )', *Pathologie Biologie*, 57(3), pp. 245–251.

Cûs, F. and Jenko, M. (2013) 'The influence of yeast strains on the composition and sensory quality of Gewürztraminer wine', *Food Technology and Biotechnology*, 51(4), pp. 547–553.

D'Amato, D. *et al.* (2006) 'Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system', *International Journal of Food Science and Technology*, 41(10), pp. 1152–1157.

Dai, C. *et al.* (2003) 'Low ultrasonic stimulates fermentation of riboflavin producing strain *Ecemothecium ashbyii*', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30, pp. 37–41.

El Darra, N. *et al.* (2013) 'Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation', *European Food Research and Technology*, 236(1), pp. 47–56.

van Dijken, J. P. *et al.* (1986) 'Alcoholic fermentation by "non-fermentative" yeasts.', *Yeast (Chichester, England)*. England, 2(2), pp. 123–127.

Dubourdieu, D. *et al.* (2006) 'The role of yeast in grape flavour development during fermentation: The example of Sauvignon blanc', *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(1), pp. 81–88.

Dunn, J. E. and Pearlman, J. S. (1987) 'Methods and apparatus for extending the shelf life of fluid food products'.

Dutta, D., Asmar, A. and Stacey, M. (2015) 'Effects of nanosecond pulse electric fields on cellular elasticity', *Micron (Oxford, England : 1993)*. 2015/02/13, 72, pp. 15–20.

Earnshaw, R. G., Appleyard, J. and Hurst, R. M. (1995) 'Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure', *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), pp. 197–219.

Eurostat (2015) *Agriculture, forestry and fishery statistics 2015*.

Feldman, D. (1989) 'Sonochemistry, theory, applications and uses of ultrasound in chemistry', *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters*, 27(13), p. 537.

Ferree, D. and Warrington, I. (2015) *Apples Botany, Production and Uses, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*.

Fleet, G. (1992) *Spoilage yeasts, Critical Reviews in Biotechnology*.

- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribereau-Gayon, P. (1984) 'Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines', *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), pp. 1034–1038.
- Flores, C.-L. *et al.* (2000) 'Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts', *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), pp. 507–529.
- Fologea, D. *et al.* (1998) 'Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses', *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.*, 46(2), pp. 285–287.
- Francesca Comitini *et al.* (2011) 'Selected non- *Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines', *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 44(5), pp. 15–23.
- Funk, R. H. W., Monsees, T. and Özkucur, N. (2009) 'Electromagnetic effects – From cell biology to medicine', *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43(4), pp. 177–264.
- Galv, L. and Carciochi, R. A. (2018) 'Fermentation assisted by pulsed electric field and ultrasound : A Review', *Fermentation*, 4, pp. 1–12.
- Garijo, P. *et al.* (2015) 'Analysis of grapes and the first stages of the vinification process in wine contamination with *Brettanomyces bruxellensis.*', *European Food Research and Technology*, 240.
- Góngora-Nieto, M. M. *et al.* (2002) 'Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects', *LWT - Food Science and Technology*, 35(5), pp. 375–388.
- Goodman, E. M., Greenebaum, B. and Marron, M. T. (1995) 'Effects of electromagnetic fields on molecules and cells.', in Jeon, K. W. and Jarvik, J. (eds). Academic Press (International Review of Cytology), pp. 279–338.
- Goodman, R. and Blank, M. (1998) 'Magnetic field stress induces expression of hsp70', *Cell stress and chaperones*. Cell Stress Society International, 3(2), pp. 79–88.
- Graça, A. *et al.* (2015) 'Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple', *Food Microbiology*, 51, pp. 179–185.
- Guerrero, S., Tognon, M. and Alzamora, S. M. (2005) 'Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan', *Food Control*, 16(2), pp. 131–139.
- Guyot, S. *et al.* (1998) 'Reversed-Phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), pp. 1698–1705.
- Hall, H. *et al.* (2017) 'Impact of yeasts present during prefermentation cold maceration of Pinot noir grapes on wine volatile aromas', *American Journal of Enology and Viticulture*. American

- Journal of Enology and Viticulture, 68(1), pp. 81–90.
- Heinz, V. and Alvarez, I. (2002) ‘Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design’, 12, pp. 103–111.
- Heinz, V., Toepfl, S. and Knorr, D. (2003) ‘Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment’, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(03), pp. 167–175.
- Ho, S. Y. and Mittal, G. S. (1996) ‘Electroporation of cell membranes: a review.’, *Critical reviews in biotechnology*. England, 16(4), pp. 349–362.
- Hohmann, S. (2003) *Yeast stress responses*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London.
- Horisawa, S., Sakuma, Y. and Doi, S. (2013) ‘Identification and species-typing of wood rotting fungi using melting curve analysis’, *Journal of Wood Science*, 59, pp. 432–441.
- Hu, K., Jin, G.-J., Mei, W.-C., *et al.* (2018) ‘Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/ *S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement’, *Food Chemistry*, 239, pp. 495–501.
- Hu, K., Jin, G.-J., Xu, Y.-H., *et al.* (2018) ‘Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* .’, *Food research international (Ottawa, Ont.)*. Canada, 108, pp. 119–127.
- Huang, E., Mittal, G. S. and Griffiths, M. W. (2006) ‘Inactivation of *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound’, *Biosystems Engineering*, 94(3), pp. 403–413.
- Huezo, L., Shah, A. and Michel, F. (2019) ‘Effects of ultrasound on fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*.’, *Fermentation*, 5, pp. 1–16.
- Hülshager, H. and Niemann, E.-G. (1980) ‘Lethal effects of high-voltage pulses on *E. coli* K12’, *Radiation and Environmental Biophysics*, 18(4), pp. 281–288.
- Hülshager, H., Potel, J. and Niemann, E.-G. (1983) ‘Electric field effects on bacteria and yeast cells’, *Radiation and Environmental Biophysics*, 22(2), pp. 149–162.
- Hunt, R. W. *et al.* (2009) ‘Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications’, *International journal of molecular sciences*. Molecular Diversity Preservation International (MDPI), 10(10), pp. 4515–4558.
- Institut français des productions cidricoles (2009) *Pomme à cidre - Les variétés*.
- Izadifar, Z., Babyn, P. and Chapman, D. (2019) ‘Ultrasound cavitation/microbubble detection and medical applications’, *Journal of Medical and Biological Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 39(3), pp. 259–276.
- Jain, R. K. and Bal, S. (1997) ‘Properties of Pearl Millet’, pp. 85–91.
- Jiang, X. Z. *et al.* (2019) ‘Study of mechanisms for electric field effects on ethanol oxidation

via reactive force field molecular dynamics’, *Proceedings of the Combustion Institute*. Elsevier Inc., 37(4), pp. 5525–5535.

Jolly, N. P., Varela, C. and Pretorius, I. S. (2014) ‘Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered.’, *FEMS yeast research*. England, 14(2), pp. 215–237.

Jomdecha, C. (2006) ‘The research of low-ultrasonic energy affects to yeast growth in fermentation process’, in.

Joyce, E. *et al.* (2003) ‘The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6), pp. 315–318.

Joyce, E., Al-Hashimi, A. and Mason, T. J. (2011) ‘Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry’, *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), pp. 862–870.

Klomklieng, W. and Prateepasen, A. (2011) ‘Using low-power ultrasonic for enhancing *Saccharomyces cerevisiae* M30 productivity for ethanol producing from molasses’, *Int. Proc. Chem., Biol. Environ. Eng.*, 9.

Koda, S. *et al.* (2009) ‘Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500kHz’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(5), pp. 655–659.

Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (2006) ‘Yeast systematics and phylogeny - Implications of molecular identification methods for studies in ecology’, in Péter, G. and Rosa, C. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 11–30.

Lambrechts, M. and Pretorius, I. (2000) ‘Yeast and its importance to wine aroma - A Review’, *South african journal for enology and viticulture*, 21(June), pp. 97–129.

Lanchun, S., Bochu, W., Liancai, Z., *et al.* (2003) ‘The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* .’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1), pp. 61–66.

Lanchun, S., Bochu, W., Zhiming, L., *et al.* (2003) ‘The research into the influence of low-intensity ultrasonic on the growth of *S.cerevisiae*.’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30, pp. 43–49.

Lange, H. *et al.* (1993) ‘Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions.’, *Biotechnology Techniques*, 7(3), pp. 223–228.

Lea Andrew G. H., J. R. P. (2003) ‘Cidermaking’, in *Fermented Beverage Production*. Second Edi. Kluwer Academic /Plenum, New York.

Lee, D. U., Heinz, V. and Knorr, D. (2003) ‘Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg’, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(4), pp. 387–393.

- Leong, T., Ashokkumar, M. and Kentish, S. (2011) 'The fundamental of power ultrasound - A review', *Acoustics Australia*, 39(2).
- Lleixa, J. *et al.* (2016) 'Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* .', *Frontiers in microbiology*. Switzerland, 7, p. 338.
- Loghavi, L., Sastry, S. K. and Yousef, A. E. (2008) 'Effect of moderate electric field frequency on growth kinetics and metabolic activity of *Lactobacillus acidophilus* ', *Biotechnology Progress*, 24, pp. 148–153.
- López-Domènech, S., Mateo, J. and Maicas, S. (2015) 'Screening of *Hanseniaspora* strains for the production of enzymes with potential interest for winemaking.', *Fermentation*, 2, p. 1.
- López, M. C., Mateo, J. J. and Maicas, S. (2015) 'Screening of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Xylosidase activities in four non - *Saccharomyces* yeast isolates', *Journal of Food Science*, 80(8), pp. C1696–C1704.
- López, N. *et al.* (2008a) 'Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety', *European Food Research and Technology*, 227(4), p. 1099. doi: 10.1007/s00217-008-0825-y.
- López, N. *et al.* (2008b) 'Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), pp. 477–482.
- Loureiro, V. and Malfeito-Ferreira, M. (2003) 'Spoilage yeasts in the wine industry', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 23–50.
- Ma, Y.-Q. *et al.* (2008) 'Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel.', *Journal of Food Science*, 73(8), pp. T115–T120.
- Mangas, J. J. *et al.* (1999) 'Study of the phenolic profile of cider apple cultivars at maturity by multivariate techniques', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), pp. 4046–4052.
- Martín, V., Giorello, F., *et al.* (2016) 'De novo synthesis of benzenoid compounds by the yeast *Hanseniaspora vineae* increases the flavor diversity of wines.', *Journal of agricultural and food chemistry*. United States, 64(22), pp. 4574–4583.
- Martín, V., Boido, E., *et al.* (2016) 'Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains.', *Yeast (Chichester, England)*. England, 33(7), pp. 323–328.
- Martín, V. *et al.* (2018) 'Oenological impact of the *Hanseniaspora* /*Kloeckera* yeast genus on wines - A Review', *Fermentation*, 4, p. 76.
- Martínez, J., Millán, C. and Ortega, J. M. (1989) 'Growth of natural flora during fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximenez" grapes', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 10(2), pp. 31–35.
- Mason, T. (1991) *Practical Sonochemistry. A Users Guide to Applications in Chemistry and*



*Chemical Engineering.*

Mason, T. J. (1996) 'Sonochemistry: Uses of ultrasound in chemistry and related disciplines', in Siegel, R. J. (ed.) *Ultrasound Angioplasty*. Boston, MA: Springer US, pp. 25–54.

Mason, T. J. and Lorimer, J. P. (1989) 'Sonochemistry, theory, applications and uses of ultrasound in chemistry', *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters*, 27(13), p. 537.

Mastwijk, H. C. and Bartels, P. V (2000) 'Integrated modular design of a pulsed electrical field treatment chamber'.

Matsumoto, Y. *et al.* (1991) 'Inactivation of microorganisms by pulsed high voltage application', in *Conference Record of the 1991 IEEE Industry Applications Society Annual Meeting*, pp. 652–659 vol.1.

Mattar, J. R. *et al.* (2013) 'Stimulation of grape juice fermentation using moderate pulsed electric field treatment', *Récents Progrès En Génie Des Procédés*, p. 104.

Mattar, J. R. *et al.* (2014) 'Stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures by Pulsed Electric Fields', *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), pp. 3328–3335.

Mattar, J. R. J. R. *et al.* (2015) '*S. cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments', *Bioelectrochemistry*. Elsevier B.V., 103, pp. 92–97.

McDonald, C. j. *et al.* (2000) 'Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm', *Journal of Food Science*, 65(6), pp. 984–989.

Medina, K. *et al.* (2013) 'Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae* ', *Food Chemistry*, 141(3), pp. 2513–2521.

Medina, K. *et al.* (2018) 'Effects of non- *Saccharomyces* yeasts on color, anthocyanin, and anthocyanin-derived pigments of tannat grapes during fermentation', *American Journal of Enology and Viticulture*. American Journal of Enology and Viticulture, 69(2), pp. 148–156.

Meng, S., Rouabhia, M. and Zhang, Z. (2011) 'Electrical stimulation in tissue regeneration.', in *Applied Biomedical Engineering*.

Mizuno, A. and Hori, Y. (1991) 'Destruction of Living Cells by Pulsed High-Voltage Application', 24(3).

Mohamed, M. E. A. and Eissa, A. H. A. (2012) *Pulsed electric fields for food processing technology*.

Mohsenin, N. N. (1980) *Physical properties of plant and animal materials.*, Gordon and Breach Sci. Publ. Inc., New York, USA. Gordon and Breach Sci. Publ. Inc., New York, USA.

Molinari, P., Pilosof, A. M. R. and Jagus, R. J. (2004) 'Effect of growth phase and inoculum size on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juices, by pulsed electric fields', *Food Research International*, 37(8), pp. 793–798.

- Montané, M. H. and Teissié, J. (1992) 'Electrostimulation of plant protoplast division: Part 1.'
- Moreira, N. *et al.* (2005) 'Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts', *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), pp. 285–294.
- Moreira, N. *et al.* (2008) 'Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must', *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), pp. 231–238.
- Morshuis, P. H. F. *et al.* (2002) 'Treatment apparatus method for preserving pumpable food products in a pulsed electric field.'
- Mota, M. J. *et al.* (2018) 'Fermentation at non-conventional conditions in food- and bio-sciences by the application of advanced processing technologies', *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), pp. 122–140.
- Nacional, C. and Alimentación, D. (2009) *Tablas Peruanas De Composición De Alimentos*.
- Naksnishi, K. *et al.* (1998) 'Effect of electric current on growth and alcohol production by yeast cells.', *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(2), pp. 250–253.
- Nesaratnam, S. T., Wase, D. A. J. and Blakebrough, N. (1982) 'The susceptibility to ultrasonic disintegration of *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418', *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 15(1), pp. 56–58.
- Neumann, E. (1992) 'Membrane electroporation and direct gene transfer', *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 28(1), pp. 247–267.
- Neumann, E. and Rosenheck, K. (1972) 'Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes', *The Journal of Membrane Biology*, 10(1), pp. 279–290.
- Neumann, E., Sowers, A. E. and Jordan, C. A. (2002) *Electroporation and Electrofusioin in Cell Biology*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*.
- Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K. and Zhou, W. (2009) 'Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by highintensity ultrasound', *International Dairy Journal*, 19(6), pp. 410–416.
- Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K. and Zhou, W. (2012) 'Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation', *Food Chemistry*, 130(4), pp. 866–874.
- Nicolas, J. J. *et al.* (1994) 'Enzymatic browning reactions in apple and apple products.', *Critical reviews in food science and nutrition*. United States, 34(2), pp. 109–157.
- Nikolic, S. *et al.* (2010) 'Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 122(1), pp. 216–222.

- Nogueira, A. *et al.* (2008) 'Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(5), pp. 1025–1032.
- Padilla, B., Gil, J. V. and Manzanares, P. (2016) 'Past and future of non- *Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity', *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), pp. 1–20.
- Palaniappan, S. and Sastry, S. K. (1990) 'Effects of electricity on microorganisms : A review', *Journal of Food Processing and Preservation*, 14, pp. 393–414.
- Pankiewicz, U. *et al.* (2006) 'Optimization of selenium accumulation in *Rhodotorula rubra* cells by treatment of culturing medium with pulse electric field', *International Agrophysics*, 20(2), pp. 147–152.
- Pankiewicz, U. and Jamroz, J. (2008) 'Accumulation of selenium and catalase activity changes in the cells of *Saccharomyces cerevisiae* on pulsed electric field (PEF) treatment', *Annals of Microbiology*, 58(2), p. 239.
- Pankiewicz, U. and Jamroz, J. (2010) 'Effect of pulsed electric fields upon accumulation of magnesium in *Saccharomyces cerevisiae* ', *European Food Research and Technology*, 231(5), pp. 663–668.
- Pankiewicz, U. and Jamroz, J. (2011) 'Effect of pulsed electric fields upon accumulation of zinc in *Saccharomyces cerevisiae* ', *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(6), p. 646–651.
- Park, J. (2014) *Characterizing and Improving the Oral Sensations and Preference of Polyphenol-Rich Aronia Berry Juice*. Honors Scholar Theses.348.
- Pejin, J. D., Gruji, O. S. and Markovi, M. N. (2012) 'Increase in bioethanol production yield from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with application of ultrasound', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(May 2011), pp. 170–176.
- Pérez, G. *et al.* (2011) 'A quick screening method to identify  $\beta$ -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), pp. 47–55.
- Perez, V. H. *et al.* (2007) 'Bioreactor coupled with electromagnetic field generator: Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*', *Biotechnology Progress*, 23(5), pp. 1091–1094.
- Petrik, M., Kappeli, O. and Fiechter, A. (1983) 'An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum* : Involvement of short- and long-term regulation', (1983), pp. 43–49.
- Petrofsky, J. *et al.* (2006) 'Effect of electrical stimulation on bacterial growth', *Wound Repair and Regeneration*, 83(4), pp. 17–29.
- Piskur, J. *et al.* (2006) 'How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?', *Trends in*

*genetics* : *TIG*, 22(4), pp. 183–186.

Pizzichemi, M. (2007) ‘Application of pulsed electric fields to food treatment’, *Nuclear Physics B - Proceedings Supplements*, 172, pp. 314–316.

*Pome fruit value chain assessment report*. (2014).

Prasanna, G. L. and Panda, T. (1997) ‘Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology’, *Bioprocess Engineering*, 16(5), pp. 261–264.

Pretorius, I. S. (2000) ‘Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking’, *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd, 16(8), pp. 675–729.

Pretorius, I. S., van der Westhuizen, T. J. and Augustyn, O. P. H. (1999) ‘Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the south african wine industry.’, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20(2), pp. 61–75.

Prochownick, L. and Spaeth, F. (1890) ‘Über die keimtötende Wirkung des galvanischen Stroms’, *Deutsche Medizinische Wochenschrift - DEUT MED WOCHENSCHR*, 16, pp. 564–565.

Pronk, J. T., Steensma, H. Y. and Dijken, J. P. Van (1996) ‘Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.’, *Yeast (Chichester, England)*, 12(16), pp. 1607–1633.

Pulidindi, I. *et al.* (2012) ‘Mild sonication accelerates ethanol production by yeast fermentation’, *Energy and Fuels*, 26, pp. 2352–2356.

Qin, B.-L. *et al.* (1998) ‘Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system’, *IEEE Transactions on Industry Applications*, 34(1), pp. 43–50.

Radel, S. *et al.* (2000) ‘Viability of yeast cells in well controlled propagating and standing ultrasonic plane waves’, *Ultrasonics*, 38(1), pp. 633–637.

Rantsiou, K. *et al.* (2012) ‘*Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations’, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), pp. 1987–1994.

Raso, J. *et al.* (2000) ‘Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields’, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), pp. 21–29.

Redzepovic, S. *et al.* (2003) ‘Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation.’, *International journal of food microbiology*. Netherlands, 83(1), pp. 49–61.

Renard, C. M. G. C. *et al.* (2001) ‘Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: Quantification and some consequences’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 29(2), pp. 115–125.

Ribereau-Gayon, P. *et al.* (2006) *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2nd edn. John Wiley & Sons, Ltd.

- Ribereau-Gayon, P., Lafon-Lafourcade, S. and Bertrand, A. (1975) 'Conn. Vigne Vin', *Connaissance Vigne Vin*, 9, pp. 117–139.
- Rocha-Leão, M. H. *et al.* (2005) 'Biochemical cell responses to electrical stress stimulation', *Proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, Rio de Janeiro, Brazil*, (February), pp. 14–18.
- Rocha-Leão, M. H., Coelho, M. A. and Araujo, O. (2003) 'Impact of the REG1 mutation on printed in Brazil glycogen accumulation and glucose consumption rates in *Saccharomyces cerevisiae* cells based on a macrokinetic model', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20.
- Röcker, J., Schmitt, M., *et al.* (2016) 'The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine.', *Food Chemistry*, 210, pp. 660–670.
- Röcker, J., Strub, S., *et al.* (2016) 'Usage of different aerobic non- *Saccharomyces* yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines.', *European Food Research and Technology*, 242(12), pp. 2051–2070.
- Rodrigues, Fernando Ludovico, Paula Leao, C. (2005) 'Sugar metabolism in yeasts: An overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism', in *The Yeast Handbook*, pp. 101–122.
- Rojas, V. *et al.* (2001) 'Studies on acetate ester production by non- *Saccharomyces* wine yeasts', *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), pp. 283–289.
- Rojas, V. *et al.* (2003) 'Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), pp. 181–188.
- Rols, M. P. *et al.* (1990) 'Control of electric field induced cell membrane permeabilization by membrane order', *Biochemistry*. American Chemical Society, 29(12), pp. 2960–2966.
- Romano, P. *et al.* (2003) 'Function of yeast species and strains in wine flavour', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 169–180.
- Romano, P. and Suzzi, G. (1993) 'Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts', *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), pp. 541–545.
- Roohinejad, S. *et al.* (2018) 'Mechanisms of Microbial Inactivation by Emerging Technologies', in Barba, F. J. *et al.* (eds) *Innovative Technologies for Food Preservation*. Academic Press, pp. 111–132.
- Rosi, I., Vinella, M. and Domizio, P. (1994) 'Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of enological origin', *Journal of Applied Bacteriology*, 77(5), pp. 519–527.
- Russell, N. J. (2002) 'Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview', *International Journal of Food Microbiology*, 79(1), pp. 27–34.
- Saadeh, L. (2016) *Lebanese apples dethroned as the king of Fruits*.
- Sale, A. J. H. and Hamilton, W. A. (1967) 'Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*,

148(3), pp. 781–788.

Salleh-Mack, S. Z. and Roberts, J. S. (2007) ‘Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(3), pp. 323–329.

Santos, H. and Capelo, J. (1999) ‘Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment.’, *Talanta*, (73), pp. 795–802.

Santos, H. M., Lodeiro, C. and Capelo-Martínez, J.-L. (2009) ‘The Power of Ultrasound’, in *Ultrasound in Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–16.

Scheffers, W. A. (1966) ‘Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen’, *Nature*, 210(5035), pp. 533–534.

Schläfer, O. *et al.* (2000) ‘Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors’, *Ultrasonics*, 38, pp. 711–716.

Sensoy, I., Zhang, Q. H. and Sastry, S. K. (1997) ‘Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric field’, *Journal of Food Process Engineering*, 20(5), pp. 367–381.

Shamtsyan, M. (2012) ‘The influence of electric field on microbial growth’, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 1, pp. 88–92.

Shinohara, T., Kubodera, S. and Yanagida, F. (2000) ‘Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation’, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1), pp. 90–97.

Simpson, J. *et al.* (1995) ‘Increased ethanol production during growth of electric-field stimulated *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media at 45C’, *Biotechnology Letters*, 17(7), pp. 757–760.

Spagna, G. *et al.* (2002) ‘Properties of endogenous beta -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines’, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, pp. 1030–1035.

Stacey, M. *et al.* (2003) ‘Differential effects in cells exposed to ultra-short , high intensity electric fields : cell survival , DNA damage , and cell cycle analysis’, 542, pp. 65–75.

Stanbury, P., Whitaker, A. and Hall, S. (2017) *Principles of fermentation technology: Third Edition, Principles of Fermentation Technology*.

Sulaiman, A. Z. *et al.* (2011) ‘Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity’, *Biochemical Engineering Journal*, 54(3), pp. 141–150.

Swiegers, J. H. *et al.* (2005) ‘Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour’, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), pp. 139–173.

Symoneaux, R. *et al.* (2014) ‘Impact of apple procyanidins on sensory perception in model cider (part 1): Polymerisation degree and concentration’, *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 57(1), pp. 22–27.



- Tanino, T. *et al.* (2012a) 'Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field', *Journal of Electrostatics*. Elsevier Ltd, 70(2), pp. 212–216.
- Tanino, T. *et al.* (2012b) 'Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field', *Journal of Electrostatics*, 70(2), pp. 212–216.
- Teissié, J. *et al.* (2002) 'Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review', *Bioelectrochemistry*, 55, pp. 107–112.
- Teixidó, N. *et al.* (1999) 'Microbial population dynamics on golden delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications', *Annals of Applied Biology*, 134(1), pp. 109–116.
- Teusink, B. *et al.* (1998) 'Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%.', *Journal of bacteriology*. United States, 180(3), pp. 556–562.
- Thacker, J. (1973) 'An approach to the mechanism of killing of cells in suspension by ultrasound', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 304(2), pp. 240–248.
- Thangavadivel, K. *et al.* (2013) 'Influence of reactor shapes on residence time distribution and methyl orange degradation efficiency in a continuous process under indirect 200 kHz sonication.', *Industrial and Engineering Chemistry Research*.
- Thierie, J. and Penninckx, M. (2010) 'Crabtree Effect', *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, (November 2017), pp. 1–17.
- Timmermans, R. A. H. *et al.* (2014) 'Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 173, pp. 105–111.
- Tristezza, M. *et al.* (2016) 'The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production', *Frontiers in Microbiology*, 7, p. 670.
- Tsong, T. Y. (1991) 'Electroporation of cell membranes', *Biophysical journal*, 60(2), pp. 297–306.
- Tsukamoto, I., Constantinoiu, E., *et al.* (2004) 'Inactivation effect of sonication and chlorination on *Saccharomyces cerevisiae*. Calorimetric Analysis', *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3), pp. 167–172.
- Tsukamoto, I., Yim, B., *et al.* (2004) 'Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation', *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(2), pp. 61–65.
- Ubeda, J. and Briones, A. (2000) 'Characterization of differences in the formation of volatiles during fermentation within synthetic and grape musts by wild *Saccharomyces* strains', *LWT - Food Science and Technology*, 33(6), pp. 408–414.
- Ugliano, M. *et al.* (2006) 'Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains', *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), pp. 6322–6331.
- USAD (2018) *Fresh Deciduous Fruit : World Markets and Trade (Apples, Grapes & Pears)*.
- Valero, M. *et al.* (2007) ‘Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing’, *Journal of Food Engineering*, 80(2), pp. 509–516.
- Valois, S., Merwin, I. A. and Padilla-Zakour, O. I. (2006) ‘Characterization of fermented cider apple cultivars grown in upstate New York’, *Journal of the American Pomological Society*, 60(3), pp. 113–128.
- Viana, F. *et al.* (2008) ‘Rational selection of non- *Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits’, *Food Microbiology*, 25(6), pp. 778–785.
- Viana, F. *et al.* (2011) ‘Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae* – *Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production’, *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), pp. 235–240.
- Vivek, K., Subbarao, K. V and Srivastava, B. (2016) ‘Optimization of postharvest ultrasonic treatment of kiwifruit using RSM’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, pp. 328–335.
- Weaver, J. C. and Chizmadzhev, Y. A. A. (1996) ‘Theory of electroporation: A review’, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(2), pp. 135–160.
- Wibetoe, G. *et al.* (1999) *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry*.
- Wijmsman, M. R. *et al.* (1984) ‘Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect).’, *Antonie van Leeuwenhoek*. Netherlands, 50(2), pp. 183–192.
- Wood, B. E., Aldrich, H. C. and Ingram, L. O. (1997) ‘Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper’, *Biotechnology Progress*, 13(3), pp. 232–237.
- Wouters, P. C. and Smelt, J. P. P. M. (1997) ‘Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: Potential for food preservation’, *Food Biotechnology*. Taylor & Francis, 11(3), pp. 193–229.
- Xu, J., Xu, Z. and Zheng, W. (2017) ‘A Review of the antiviral role of green tea catechins’, *Molecules*, 22(8).
- Yeo, S.-K. and Liong, M.-T. (2011) ‘Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk’, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, pp. 885–897.
- Yeo, S.-K. and Liong, M.-T. (2013) ‘Effect of electroporation on viability and bioconversion of isoflavones in mannitol-soymilk fermented by lactobacilli and bifidobacteria’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), pp. 396–409.
- Zakhem, H. El *et al.* (2006) ‘Behavior of yeast cells in aqueous suspension affected by pulsed

electric field', 300, pp. 553–563.

Zelle, R. M. *et al.* (2008) 'Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* : Engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology Journals, 74(9), pp. 2766–2777.

Zhang, Q. *et al.* (1996) 'Batch mode food treatment using pulsed electric fields'.

Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. V and Swanson, B. G. (1995) 'Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization', *Journal of Food Engineering*, 25(2), pp. 261–281.

Zhong, K., Chen, F. and Wang, Z. (2005) 'Inactivation and kinetic model for the *Escherichia coli* treated by a co-axial pulsed electric field', pp. 752–758.

Zimmermann, U. *et al.* (1976) 'Effects of external electrical fields on cell membranes', *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 3(1), pp. 58–83.

Zimmermann, U. (1986) 'Electrical breakdown, electroporation and electrofusion', in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 105*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 175–256.

Zimmermann, U., Pilwat, G. and Riemann, F. (1974) 'Dielectric breakdown of cell membranes', *Biophysical journal*, 14(11), pp. 881–899.

Zohre, D. E. and Erten, H. (2002) 'The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation', *Process Biochemistry*, 38(3), pp. 319–324.