



HAL
open science

Utilisation de levures non *Saccharomyces* en œnologie : études des interactions entre *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes

Quoc Phong Lai

► **To cite this version:**

Quoc Phong Lai. Utilisation de levures non *Saccharomyces* en œnologie : études des interactions entre *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2010. Français. NNT : 2010INPT0078 . tel-04274823

HAL Id: tel-04274823

<https://theses.hal.science/tel-04274823v1>

Submitted on 8 Nov 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :
Quoc Phong LAI

le : mardi 16 novembre 2010

Titre :
Utilisation de levures non Saccharomyces en oenologie : études des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes

JURY

Jean - Michel SALMON et Marielle BOUIX (Rapporteurs)
Pierre STREHAIANO (Président)
Anne JULIEN-ORTIZ (Membre)
Patricia TAILLANDIER (Membre)
Cédric BRANDAM (Membre)

Ecole doctorale :
Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :
Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503

Directeur(s) de Thèse :
Patricia TAILLANDIER
Cédric BRANDAM

Rapporteurs :
Jean - Michel SALMON
Marielle BOUIX

Remerciements

Je remercie d'abord Mesdames Marielle Bouix (Rapporteur) et Anne Julien Ortiz (Invitée du Jury) ainsi que Messieurs Jean Michel Salmon (Rapporteur) et Pierre Strehaiano (Président du Jury) d'avoir accepté la charge de juger ce travail.

J'exprime toute ma sincère gratitude à Madame Patricia Taillandier qui m'a offerte l'opportunité de faire cette thèse et qui m'a dirigé tout au long du développement de ce travail. J'ai apprécié ses aides précieuses quotidiennes. Qu'elle reçoit ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Cédric Brandam d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Sa disponibilité, son attention, ses conseils et ses encouragements m'ont été très précieux. Je lui exprime toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Monsieur Pierre Strehaiano. Il s'est très intéressé à mes travaux et il me donne souvent des conseils précieux et scientifiques.

Je remercie également Madame Claire Albasi et Monsieur Jean-Pierre Monna pour leurs conseils scientifiques et leur aide précieuse dans l'utilisation du bioréacteur à membrane.

Je n'oublierai jamais les bons moments passés au laboratoire en compagnie de tous mes collègues. Je pense particulièrement à Caroline, Youssef, Huberson, Nancy, Dominique, Alain, Luis, Benjamin, Coraline, Naura et Julien...

Enfin, je remercie tout mon entourage, ma femme, ma fille et particulièrement mes parents, qui sont loin de moi, m'ont apporté leur soutien pendant ces trois années. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous porte.

Résumé

L'utilisation de souches de levures sélectionnées pour réaliser la FA est une pratique très répandue en œnologie. Après le développement de l'utilisation de levains de souche pure de *Saccharomyces*, l'innovation est aujourd'hui dans la mise en œuvre de levains mixtes de *Saccharomyces* et de non-*Saccharomyces* qui permettent de diversifier les produits finaux obtenus. La problématique réside dans l'existence d'interactions entre les souches rendant difficile la maîtrise de la fermentation. *T. delbrueckii* présente dans la flore indigène du moût de raisin est une des levures non-*Saccharomyces* les plus appropriées pour entrer dans la composition de ces levains mixtes. En effet, elle présente une bonne capacité fermentaire et peut permettre d'augmenter la complexité aromatique du vin ou encore de réduire son acidité volatile. L'objectif de ce travail était d'étudier les interactions pendant la FA entre des souches sélectionnées pour l'œnologie : une *T. delbrueckii* et une *S. cerevisiae*. Pour cela des expériences ont été réalisées dans des milieux synthétiques simulant le moût de raisins blancs. Le comportement des souches pures a tout d'abord été caractérisé. Il a été montré que la souche *S. cerevisiae* avait de meilleures performances fermentaires d'un point de vue cinétique que la souche *T. delbrueckii*. Toutefois, *T. delbrueckii* a montré des capacités acceptables pour épuiser les sucres et surtout a permis d'obtenir des profils aromatiques différents. Le comportement vis-à-vis de l'oxygénation des moûts de ces deux levures est assez semblable, *T. delbrueckii* étant cependant beaucoup plus sensible à ce paramètre que *S. cerevisiae*. L'interaction entre ces deux levures a ensuite été étudiée dans un bioréacteur à membrane sous anaérobiose stricte dans différentes conditions : composition en azote assimilable du milieu et stratégie d'inoculation. Il a été clairement mis en évidence que *T. delbrueckii* était affectée par la présence de *S. cerevisiae*. Le type d'interaction soupçonné est celui d'amensalisme lié à l'excrétion par *S. cerevisiae* d'un constituant toxique pour *T. delbrueckii*. Dans ces conditions, la stratégie d'inoculation recommandée est l'ensemencement séquentiel des levures : *T. delbrueckii* en début de fermentation, puis l'ajout de *S. cerevisiae* 48 h après. Ceci permet à *T. delbrueckii* de se développer et d'exprimer son potentiel aromatique avant que *S. cerevisiae* ne soit introduit pour assurer une fin rapide de la fermentation. Toutefois, nous avons montré que même dans ces conditions, l'implantation de *T. delbrueckii* n'était pas garantie car, le moût n'étant pas stérile, une présence, même faible, de *S. cerevisiae* dans la flore naturelle peut inhiber sa croissance. Par ailleurs, il a été mis en évidence que dans les mouts à faible teneur en azote initial, ce constituant pouvait être épuisé au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae*. Dans ces conditions, *S. cerevisiae* ne peut se développer et l'achèvement de la fermentation est alors problématique.

Mots clefs : *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, interactions levuriennes, vin, aération, fermentations mixtes, séquentielles, qualité aromatique du vin, esters, bioréacteurs à membranes.

Abstract

The use of the selected yeast strains to realize the alcoholic fermentation is very prevalent practice in vinification. After the development of utilization of the preparation of pure *Saccharomyces cerevisiae* strain, the innovation is now to apply the mixte starter cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* that allow to diversifying the obtained final products. The problem resides in the existence of interactions between the strains giving the difficulty to controle the fermentation. *Torulaspora delbrueckii* present in the indigenous flora of the grape must is one of the most appropriate non-*Saccharomyces* yeasts to enter in the composition of these multistater cultures. In fact, this strain has been presented a good fermentative capacity and could allow to increasing not only the aromatic complexity of wine, but also to reducing its volatile acidity. The objective of our work is to study the interactions during the alcoholic fermentation between the selected strains for enology: one *T. delbrueckii* and one *S. cerevisiae*. For this reason, the experiments were realized in the synthetic mediums simulated to the white grape must. The behaviours of the pure strains were firstly characterized. It was shown that the *S. cerevisiae* strain had the best fermentative performances, a critical point in comparasion with the *T. delbrueckii* strain. Nevetheless, *T. delbrueckii* showed the acceptable capacities to exhaust the sugars and especially to allow us to obtain the different aromatic profiles to that of *S. cerevisiae*. The behaviour via the oxygenation to the musts of these two yeasts is enough close, *T. delbrueckii* being however much more sensible to that parameter than *S. cerevisiae*. The interactions between these two yeasts were then studied in a membrane bioreacteur under strict anaerobie in different conditions: composition in assimilable nitrogen of the medium and strategy of inoculation. It has been clearly demonstrated that *T. delbrueckii* has been affected by the presence of *S. cerevisiae*. The suspected type of this interaction is the amensalism one bound to a toxic compound excreted by *S. cerevisiae*. In these conditions, the recommended inoculation strategy is the sequential culture of these yeasts: *T. delbrueckii* at the beginning of the fermentation, then the addition of *S. cerevisiae* after 48 h. This allows *T. delbrueckii* to develop and express its potentiel of aromatic production before the *S. cerevisiae* is introduced to assure a rapid finish of the fermentation. However, we showed that even in these conditions, *T. delbrueckii* growth has been not guaranteed because of, since the must is not sterilized, a presence even small of *S. cerevisiae* in the natural flore can inhibite the croissance of the former. It has been also demonstrated that in the must with low intitial nitrogen content, this compound could be exhausted at the moment of the *S. cerevisiae* inoculation. In these conditions, *S. cerevisiae* can not develop and the achievement of the fermentation is yet problematic.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, yeast interactions, wine, aeration, mixed and sequential fermentations, wine aroma quality, esters, membrane bioreactor

SOMMAIRE

SOMMAIRE	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
NOMENCLATURE.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I-1 Généralités sur le marché mondial du vin	5
I-2 Élaboration générale du vin.....	6
I-2-1 La fermentation alcoolique.....	7
I-2-2 La fermentation malolactique.....	7
I-3 Métabolisme des levures	8
I-3-1 Le mécanisme de la FA	9
I-3-1-1 La glycolyse.....	9
I-3-1-2 La fermentation alcoolique	10
I-3-1-3 La production de glycérol (cf. Figure I-4)	11
I-3-2 Les arômes fermentaires du vin	12
I-3-2-1 La formation des acides volatils	13
I-3-2-2 La formation des alcools supérieurs	15
I-3-2-3 La formation des esters	17
I-3-2-4 La formation des carbonyles.....	20
I-3-3 Les levures œnologiques	21
I-3-3-1 Taxonomies des levures Saccharomyces et non-Saccharomyces.....	21
I-3-3-2 Morphologies des levures Saccharomyces et non-Saccharomyces.....	22
I-3-3-3 Ecologie des levures œnologiques.....	23
I-3-3-4 Comparaison des caractéristiques de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> en œnologie.....	24
I-3-4 Les facteurs influant la FA.....	27
I-3-4-1 Sucres.....	27
I-3-4-2 Azote.....	28
I-3-4-3 Éléments minéraux (les oligo-éléments).....	29
I-3-4-4 Vitamines	30
I-3-4-5 Acides gras et facteurs anaérobies	31
I-3-4-6 Oxygène.....	32
I-3-4-7 Température	34
I-3-4-8 pH.....	36
I-3-5 Les levures œnologiques sèches actives.....	36
I-4 Interactions entre levures.....	38
I-4-1 Types d'interactions	38
I-4-2 Interactions entre des levures œnologiques.....	39
I-4-2-1 Interactions entre les Saccharomyces en vinification.....	39
I-4-2-2 Interactions entre Saccharomyces et non-Saccharomyces.....	40
I-4-2-3 Interactions entre des <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> dans la FA du vin	43
I-4-2-3-1 Mécanismes des interactions entre <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i>	43
I-4-2-3-2 Types de fermentations (Co-fermentation et fermentation séquentielle).....	45
I-4-2-3-3 Impacts des co-fermentations et fermentations séquentielles de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> sur la qualité aromatique du vin.....	45
I-5 Méthodologies d'études des interactions entre des levures œnologiques	49

I-5-1 Pour les interactions directes.....	50
I-5-2 Pour les interactions indirectes.....	50
I-5-2-1 Tubes de dialyse et supports perméables.....	50
I-5-2-2 Bioréacteurs à membrane à fibres creuses (BRM).....	51
I-6 Conclusion.....	52
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	54
II-1 Matériel.....	56
II-1-1 Micro-organismes.....	56
II-1-2 Milieux de cultures.....	56
II-2 Méthodes.....	57
II-2-1 Conduite des fermentations.....	57
II-2-1-1 Cultures pures dans différentes conditions.....	57
II-2-1-1-1 Fermentations en Erlen-Meyers.....	57
II-2-1-1-2 Fermentations en bio-fermenteurs (NBS).....	58
II-2-1-1-3 Fermentations en bioréacteur à membrane (BRM).....	59
II-2-1-2 Co-cultures (fermentations mixtes en contact indirect) en BRM.....	60
II-2-1-2-1 Fermentations séquentielles en BRM.....	60
II-2-1-2-2 Fermentations mixtes en BRM.....	61
II-2-2 Méthodes analytiques.....	61
II-2-2-1 Enumération des cellules sous microscopes.....	61
II-2-2-2 Mesure de la densité optique.....	62
II-2-2-3 Mesure du poids sec des levures.....	62
II-2-2-4 Dosage du sucre restant dans le milieu par la méthode du DNS.....	63
II-2-2-5 Dosage du glucose restant dans le milieu par.....	64
II-2-2-6 Dosage du glycérol et de l'éthanol par HPLC.....	64
II-2-2-7 Dosages enzymatiques au 'Mascott' (Lisabio, Morangis-France).....	65
II-2-2-7-1 Dosage enzymatique de l'acide L-malique : principe et protocole de ce dosage.....	65
II-2-2-7-2 Dosage enzymatique de l'acide L-lactique : principe et protocole de ce dosage.....	66
II-2-2-7-3 Dosage enzymatique de l'acide acétique : principe et protocole de ce dosage.....	67
II-2-2-7-4 Dosage de l'azote d'ammonium (NH_4^+) : Principe et protocole du dosage.....	68
II-2-2-7-5 Dosage de l'azote alpha aminé : Principe et protocole du dosage.....	68
II-2-2-7-6 Dosage de l'aide succinique par un kit enzymatique.....	69
II-2-2-7-7 Dosages des esters d'acétate.....	70
II-2-2-7-8 Dosages des teneurs en C, N, O, H des biomasses.....	70
II-2-2-7-9 Calcul de la production de CO_2 dans les FA réalisées dans les Erlen-Meyers.....	70
II-2-2-7-10 Calcul de la production d'éthanol dans les FA aérées dans les fermenteurs NBS.....	71
II-2-2-7-11 Déterminations de la composition de CO_2 et O_2 dans le gaz sortie du NBS.....	73
II-2-3 Lissage des données expérimentales.....	75
II-2-4 Calcul des erreurs expérimentales.....	76
II-2-5 Paramètres cinétiques utilisés pour l'analyse des résultats des FA.....	77

CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	78
III-1 EFFET DE L'OXYGENE SUR LE METABOLISME DE <i>TORULASPORA DELBRUECKII</i>	80
III-1-1 Introduction	82
III-1-2 Materials and Methods	83
Microorganisms.....	83
Fermentation media.....	83
Fermentation experiments	84
Compounds concentrations measurements	84
Data smoothing	85
Mathematical model to calculate ethanol evaporation.....	85
Calculation of cumulated values for CO ₂ production and O ₂ consumption.....	86
III-1-3 Results and discussions	87
Influence of the aeration on the repartition of the carbon flux.....	87
Influence of the aeration level on nitrogen balance	90
Influence of the aeration on the fermentation kinetics.....	91
III-1-4 Discussion.....	94
III-2 ANALYSE DES FERMENTATIONS PURES DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> S1 ET <i>TORULASPORA DELBRUECKII</i> NSC123	98
III.2.1 Les FA pures de <i>S. cerevisiae</i>	99
III-2-1-1 Cinétiques de FA pures de <i>S. cerevisiae</i>	100
III-2-1-2 Paramètres cinétiques des FA pures de <i>S. cerevisiae</i>	103
III-2-2 Les FA pures de <i>T. delbrueckii</i>	106
III-2-2-1 Cinétiques de FA pures de <i>T. delbrueckii</i>	107
III-2-2-2 Paramètres cinétiques des FA pures de <i>T. delbrueckii</i>	110
III-2-3 Comparaisons des FA pures entre <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i>	112
III-2-3-1 Comparaisons des fermentations pures de <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> lot 1 dans les conditions de semi-anaérobie et d'aération ménagée.....	112
III-2-3-2 Comparaisons des fermentations pures de <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> lot 1 et lot 2 dans la condition d'anaérobie stricte.....	114
Comparaison de la formation des esters pour <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> lot 2....	116
III-2-4 Conclusions	118
III-3 INTERACTIONS ENTRE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ET <i>TORULASPORA DELBRUECKII</i> PENDANT LA FERMENTATION DU VIN : INFLUENCE DE L'INOCULATION ET DE CONCENTRATION DE L'AZOTE ASSIMILABLE.....	120
III-3-1 Introduction.....	123
III-3-2 Materials and Methods.....	124
III-3-3 Results	126
III-3-3-1 Pure fermentations of <i>T. delbrueckii</i> and <i>S. cerevisiae</i>	126
III-3-3-2 Comparison of mixed and sequential fermentations with low ratio T/S.....	131
III-3-3-3 Implantation of <i>T. Delbrueckii</i> in grape must containing indigenous <i>S. cerevisiae</i>	133
III-3-3-4 Influence of nitrogen content of the grape must on sequential fermentation.....	133
III-3-4 Discussion.....	134
III-3-5 References.....	139
CHAPITRE IV. CONCLUSION GLOBALE ET PERSPECTIVES.....	140
CHAPITRE V. RÉFÉRENCES	145
ANNEXES	161

TABLE DES FIGURES

Figure I-1. Écart "production – consommation mondiale" de vins (OIV et FAO, 2009)	5
Figure I-2. Vinification en blanc et en rouge	6
Figure I-3. Schéma de la glycolyse d'Embden-Meyerhof-Parnas et la FA chez <i>S. cerevisiae</i> ...	9
Figure I-4. Schéma de la fermentation glycéropyruvique.....	11
Figure I-5. Schéma de la synthèse des composés aromatiques à partir du métabolisme des sucres, acides aminés et sulfures (Swiegers et al., 2005).....	12
Figure I-6. La formation de l'acide d'acétique	14
Figure I-7. L'image microscopique de <i>S. cerevisiae</i> (à gauche) et <i>T. delbrueckii</i> (à droite)... ..	22
Figure I-8. La diversité des levures pendant des fermentations du moût de vin blanc (A) et de vin rouge (B) (Xufre A. et al., 2006).....	23
Figure I-9. Micrographies électroniques des levures développées en anaérobiose. (Les petites flèches présentent des pro-mitochondries) (Visser et al., 1990)	33
Figure I-10. Température optimale de croissance de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> (Bunte, 2009).....	35
Figure I-11. Distribution du nombre de souches de <i>T. delbrueckii</i> par classes d'éthanol produit à 17 °C (11 souches testées) et à 24 °C (17 souches testées) dans un milieu synthétique modèle à 240 g/L de sucre.....	35
Figure I-12. Vitesse de la mortalité de population sensible dans les cultures mixtes ayant des ratios initiaux différent de levures killer/sensible (K/S)	40
Figure I-13. Concentrations cellulaire, de glucose et d'éthanol pendant les FA mixtes en contact direct de <i>K. thermotolerans</i> (A, B) et <i>T. delbrueckii</i> (C, D) avec <i>S. cerevisiae</i> (Nissen et al., 2003).....	45
Figure I-14. Concentrations cellulaire et d'éthanol pendant les FA pures de <i>K. thermotolerans</i> (A) et <i>T. delbrueckii</i> (B).....	45
Figure I-15. Concentrations cellulaire et d'éthanol pendant les FA mixtes de <i>S. cerevisiae</i> en contact indirect avec <i>K. thermotolerans</i> (A) et <i>T. delbrueckii</i> (B) dans des tubes dialyse	45
Figure I-16. Évolution de biomasse dans les co-cultures de <i>S. cerevisiae</i> / <i>T. delbrueckii</i> (à 20 °C. ■, culture pure <i>S. cerevisiae</i> (S p). (A) □, culture mixte <i>S. cerevisiae</i> (S m). ◇, culture mixte <i>T. delbrueckii</i> (T m). (B) □, culture séquentielle <i>S. cerevisiae</i> (S s). ◇, culture séquentielle <i>T. delbrueckii</i> (T s))	46
Figure I-17. Production d'esters avec des co-inoculations mixtes <i>Saccharomyces</i> / non- <i>Saccharomyces</i> (Languet et al., 2005).	47
Figure I-18. Cycle aromatique des FA pures de <i>S. cerevisiae</i> et mixtes de <i>S. cerevisiae</i> 80 % et <i>T. delbrueckii</i> 10 % et <i>K. thermotolerans</i> 10 % (Bunte 2009).	48
Figure I-19. Évaluation sensorielle de deux vins de maccabeu un mois après la mise en bouteille (Pillet et al., 2010).....	49
Figure I-20. Schéma d'un support perméable de Transwell®	51
Figure I-21. Bioréacteur à membrane pour l'étude de cultures mixtes de micro-organismes .	52
Figure II-1. Fermenteur type New Brunswick Scientific (NBS)	58
Figure II-2. FA séquentielle en BRM de <i>T. delbrueckii</i> NSC123 lot 2 et <i>S. cerevisiae</i> S1	59
Figure II-3. Cellules des <i>T. delbrueckii</i> NSC lot 2 (A) et <i>S. cerevisiae</i> S1 (B)	61
Figure II-4. Corrélations entre les poids secs et les DO _{620nm} des levures (a : <i>T. delbrueckii</i> NSC123 lot 1, b : lot 2 et c : <i>S. cerevisiae</i> S1).....	63
Figure II-5. Validation du model de calcul d'éthanol évaporé au cours des tests d'évaporation à 0,3 ; 0,6 et 1 vvm de solution (éthanol-eau, 90 g/l).....	72
Figure II-6. Schéma général de l'installation du Bio-fermenteur	73
Figure II-7. Comparaison de la valeur estimée \bar{x} à partir de m valeurs mesurées et de la valeur vraie x_0	76

Figure III-1-1. Repartition of consumed carbon flux between the metabolic pathways of AF, production of glycerol and respiration for 4 conditions of aerations.....	91
Figure III-1-2. Consumption of glucose (a) and of fructose (b) during the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.....	93
Figure III-1-3. Growth kinetics during the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.....	94
Figure III-1-4. Specific rates of sugar consumption during 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.....	94
Figure III-2-1. Evolution de l'oxygène dissous (avec la variation moins de 5 %) après chaque l'aération du milieu au temps (0h ; 17 h et 24 h) de la FA aération ménagée de <i>S. cerevisiae</i>	100
Figure III-2-2. Cinétiques de consommation du sucre (A : Glucose et B : Sucre total) de <i>S. cerevisiae</i>	101
Figure III-2-3. Cinétiques de la croissance (A : Cellules vivantes et B : Biomasse) de <i>S. cerevisiae</i>	101
Figure III-2-4. Cinétiques de production de glycérol (A) et d'éthanol (B) de <i>S. cerevisiae</i> ..	102
Figure III-2-5. Temps de consommation de l'oxygène par <i>T. delbrueckii</i> lot 1, après chaque l'aération du milieu à temps (0 h ; 17 h et 24 h) de la FA aération ménagée	106
Figure III-2-6. Cinétiques de consommation du sucre (A : Glucose et B : Sucre total) dans les FA pures de <i>T. delbrueckii</i> lot 1 (L1) et lot 2 (L2) dans les différentes conditions d'aération	107
Figure III-2-7. Cinétiques de la croissance de <i>T. delbrueckii</i> lot 1 (L1) et lot 2 (L2) (A : cellulaire vivante et B : biomasse) dans les FA pures.....	108
Figure III-2-8. Cinétiques de production de glycérol (A) et d'éthanol (B) dans les FA pures de <i>T. delbrueckii</i> dans les différentes conditions d'aération.....	109
Figure III-2-9. Caractéristiques cinétiques et biochimiques des FA pures de <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> lot 1 dans la condition semi-anaérobie (A) et l'aération ménagée (B).....	113
Figure III-2-10. Caractéristiques cinétiques et biochimiques des FA pures de <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> lot 1 dans la condition semi-anaérobie (A) et l'aération ménagée	113
Figure III-2-11. Caractéristiques cinétiques et biochimiques des fermentations pures de <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> lot 1 et lot 2 dans la condition anaérobie stricte.....	114
Figure III-3-1. Fermentation kinetics of pure, mixed and sequential cultures of <i>T. delbrueckii</i> and <i>S. cerevisiae</i> in MS300.....	129
Figure III-3-2. Cell growth kinetics of <i>S. cerevisiae</i> (a) and <i>T. delbrueckii</i> (b) in their pure, mixed and sequential cultures	130
Figure III-3-3: Kinetics of assimilable nitrogen consumption in the fermentations.....	134
Figure III-3-4. Viable cell growths (a) and sugars consumption (b) of pure and sequential cultures <i>T. delbrueckii</i> and <i>S. cerevisiae</i> in MS170.....	135

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1. Catégories physiologiques des levures du vin (Lagunas, 1981).....	11
Tableau I-2. Les principaux alcools supérieurs du vin et les acides aminés pouvant en être les précurseurs (Ribéreau-Gayon et al., 2006).....	16
Tableau I-3. Composés aromatiques dans le vin (Swiegers et al., 2005 et Francis et Newton, 2005).....	18
Tableau I-4. Les levures Saccharomyces et non-Saccharomyces	21
Tableau I-5. Besoins en nutriments des levures œnologiques	24
Tableau I-6. Production moyenne des composés volatils majeurs par 12 souches de <i>T. delbrueckii</i> dans un milieu synthétique modèle : 240 g/L de sucre à 24 °C (Renault et al., 2009).....	26
Tableau I-7. Les facteurs influant sur la croissance et l'activité fermentaire des levures.....	27
Tableau I-8. Teneurs extrêmes en facteurs de croissance des moûts et des vins (en µg/L sauf mésoinositol en mg/L) (Ribéreau-Gayon et al., 1975).....	30
Tableau I-9. Critères de sélection des levures sèches actives	37
Tableau I-10. Les procédés des co-fermentations proposés en vinification, en utilisant <i>S. cerevisiae</i> et des non-Saccharomyces (Ciani et al., 2010)	41
Tableau I-11. Interactions principales présentées dans les FA mixtes et séquentielles des vins	42
Tableau I-12. Produits secondaires de plusieurs fermentations à 20 °C (Ciani et al., 2006) ...	46
Tableau I-13. Caractéristiques des supports perméables de Transwell®.....	51
Tableau II-1. Différences principales entre <i>T. delbrueckii</i> lot 1 et lot 2	56
Tableau II-2. Composition du MS300 (Annexes 01-04).....	57
Tableau II-3. Caractéristiques du module de filtration du BRM.....	59
Tableau II-4. Préparation du mono réactif pour le dosage de l'acide L-malique.....	65
Tableau II-5. Préparation du mono réactif pour le dosage de l'acide L-lactique.....	66
Tableau II-6. Préparation du double réactif pour le dosage de l'acide acétique	67
Tableau II-7. Préparation des réactifs pour le dosage de l'azote ammoniacal.....	68
Tableau II-8. Préparation des réactifs pour le dosage de l'azote alpha-aminé.....	68
Tableau II-9. Préparation des réactifs pour le dosage de l'acide succinique	69
Table III-1-1. Elemental composition of the <i>T. delbrueckii</i> dried biomass at the end of the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM (%w/w).....	88
Table III-1-2. Final concentrations of major components in 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.....	89
Table III-1-3. Ethanol yield, consumed oxygen and produced CO ₂ during the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.....	90
Table III-1-4. Average rate of glucose and fructose consumption and duration of the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.....	93
Tableau III-2-1. Caractéristiques biochimiques des vins fermentés par <i>S. cerevisiae</i>	103
Tableau III-2-2. Paramètres cinétiques des FA pures de <i>S. cerevisiae</i>	104
Tableau III-2-3. Caractéristiques biochimiques des vins fermentés par <i>T. delbrueckii</i>	110
Tableau III-2-4. Paramètres et caractéristiques cinétiques des FA pures de <i>T. delbrueckii</i> ..	111
Tableau III-2-5. % de variation des paramètres des FA semi-anaérobie et aération ménagée par rapport à la FA anaérobie stricte.	115
Tableau III-2-6. Composition des esters dans les vins fermentés par <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> dans la condition anaérobie stricte	116
Table III-3-1: Major Constituents of wines from pure, mixed and sequential	129
Table III-3-2: Principal characteristics of all fermentations.....	129
Table III-3-3: Ester composition in fermented wines from pure, mixed and sequential fermentations in MS300	130

NOMENCLATURE

g : gramme

h : heure

Log : logarithme

M : 1 mole par litre

min : minutes

mg : milligramme

L : litre

mL : millilitre

hL : hectolitre

µm : micromètre

nm : nanomètre

v/v : volume par volume

pH : potentiel hydrogène

% : pourcentage

°C : degré Celsius

Da : Dalton

D.O : densité optique

® : marque déposée

rpm : révolution par minute

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

T. delbruecki : *Torulaspora delbrueckii*

NSC : *Non-Saccharomyces*

LSA : Levures sèches actives

MS : Milieu synthétique

FA : fermentation alcoolique

BRM : Bioréacteur à membrane

INTRODUCTION

Depuis des dizaines d'années, la sélection des souches microbiennes et le travail des œnologues ont contribué à l'amélioration de l'élaboration du vin. Ce secteur ne cesse de se développer et d'innover afin d'améliorer la qualité du vin et la productivité du procédé. La vinification implique une première étape biologique, la fermentation alcoolique (FA), siège de phénomènes biochimiques complexes. C'est une transformation biologique où les sucres, l'azote assimilable et d'autres composants du jus de raisin sont métabolisés par des levures. Il en résulte la croissance de ces micro-organismes et la conversion du sucre en éthanol, en dioxyde de carbone et en produits fermentaires secondaires comme des acides organiques, des substances aromatiques et saveurs. En vinification, les pratiques concernant la FA ont beaucoup évoluées au cours des 50 dernières années. D'une FA spontanée par la flore naturelle du raisin, les vinificateurs sont passés à une inoculation des moûts par des levures *Saccharomyces cerevisiae* sélectionnées pour leurs capacités fermentaires afin d'assurer systématiquement la réussite de la FA et une standardisation de la qualité du vin final.

Depuis quelques années cependant, plusieurs études ont démontré que la présence et la prédominance successive de différents genres de levures non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces* pendant la FA offrent de nombreux avantages : efficacité fermentaire, optimisation de la diversité des produits fermentaires, réduction des défauts organoleptiques, révélation des caractéristiques typiques du cépage, élimination des micro-organismes contaminés et pathogènes... Dans les fermentations spontanées, les non-*Saccharomyces* comme *Torulaspora*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Pichia* et *Hansenula* se développent généralement au début de la FA avant d'être remplacées progressivement par des *Saccharomyces*. Parmi les non-*Saccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii* suscite un vif intérêt au sein du monde œnologique pour sa capacité à fermenter du sucre, à augmenter la typicité et la complexité aromatique du vin, et aussi à réduire son acidité volatile. De ce fait est née l'idée de sélectionner des souches performantes de non-*Saccharomyces* et de les associer à des *Saccharomyces* pour que ces deux populations réalisent ensemble la FA. Ceci permettrait d'avoir les avantages des fermentations avec plusieurs populations, notamment au niveau aromatique, tout en garantissant une bonne maîtrise du résultat.

Cependant, faire cohabiter différents micro-organismes, même si leur nature est assez proche comme pour les non-*Saccharomyces* et les *Saccharomyces* du moût de raisin, n'est pas simple. En effet, différents types d'interactions peuvent avoir lieu : compétition, amensalisme, synergie... Ainsi, l'inhibition de non-*Saccharomyces* par des *Saccharomyces* lors de cultures mixtes a été souvent rapportée dans la littérature. Dans quelques cas, c'est l'inverse qui a été observé. Ces mécanismes d'interactions peuvent être influencés par de nombreux paramètres : composition du jus de raisin, pratiques de la cave, stratégies d'inoculation (moment, quantité)

et bien sur aussi souches des levures. De plus, l'étude des interactions entre levures morphologiquement proches est souvent fastidieuse et les mécanismes sont la plupart du temps mis en évidence de façon qualitative mais pas quantitative. Pour ce faire, il a été démontré que le bioréacteur à membrane (BRM) mis au point au Laboratoire de Génie Chimique pour l'étude des interactions indirectes entre micro-organismes est un bon outil.

L'objectif de ce travail était de mieux maîtriser la fermentation mixte des levures œnologiques *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*. Cela passe par une meilleure connaissance des interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* pendant la FA.

Dans la première partie (chapitre I), nous ferons le point sur les différentes études menées sur les interactions entre levures œnologiques en présentant également les différents outils utilisés. Nous présenterons auparavant rapidement les grandes voies métaboliques des levures et les principaux facteurs influençant la FA.

Dans le chapitre II, une récapitulation du matériel utilisé et des méthodes mise en œuvre pour les expérimentations sera exposée.

Le chapitre III est divisé en trois parties qui présentent les résultats obtenus au cours de ce travail. Nous exposerons tout d'abord les résultats concernant l'étude de l'effet de l'oxygène sur le métabolisme de *T. delbrueckii*. Les quantités d'oxygène apportées dépassent largement la gamme d'oxygénation habituellement utilisée en œnologie mais l'objectif était ici d'évaluer les capacités de consommation en oxygène de cette levure. La deuxième partie des résultats est consacrée aux cultures pures de nos souches *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Ceci permettra une comparaison de ces levures et la définition des conditions opératoires, notamment l'environnement gazeux, qui seront utilisées pour les cultures mixtes. Enfin, la troisième et dernière partie expose les résultats d'étude des interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* pendant la FA. Les stratégies d'inoculation simultanée et séquentielle sont comparées et l'effet de la concentration initiale en azote assimilable est évalué. Les première et dernière parties des résultats sont présentées sous forme d'articles.

Les principales conclusions et quelques perspectives à ce travail sont proposées dans le chapitre IV.

CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1 Généralités sur le marché mondial du vin

La production mondiale de vin est en baisse depuis l'année 2004 et stagne sur les 3 dernières années comme le montre la Figure I-1 (OIV avec la collaboration de la FAO, 2009).

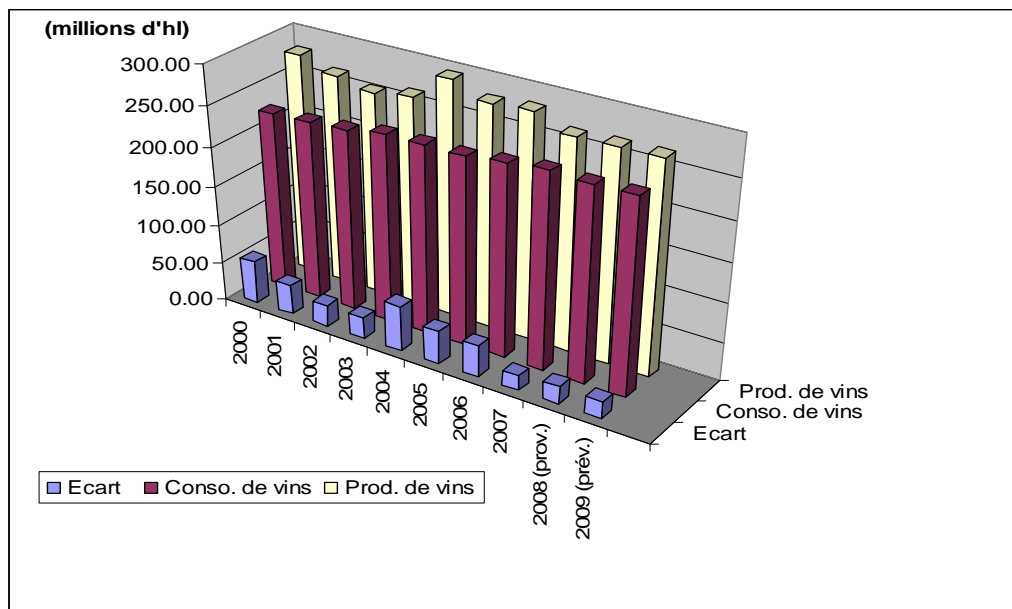


Figure I-1. Écart "production – consommation mondiale" de vins (OIV et FAO, 2009)

Cette diminution de production est due à deux facteurs :

- d'une part, à la régression des surfaces vitivinicoles : en effet, les surfaces vitivinicoles enregistrent depuis l'année 2004 un recul de 1 à 2 % surtout au sein de l'Union Européenne à 27. Cette régression enregistrée au sein de l'UE à 27 est induite par un nouveau règlement communautaire qui assure une prime d'abandon définitif pour les viticulteurs. En plus, le rythme global de croissance des surfaces plantées globalement dans l'hémisphère sud et aux Etats Unis s'est globalement ralenti par rapport à ce qui avait été observé autour de l'an 2000 et est devenu nul en 2009.

- d'autre part, à la crise économique mondiale : cette dernière affecte surtout la demande des pays importateurs les plus touchés par la crise (par exemple Russie, Pays-Bas,...). Les informations collectées par l'OIV, en Espagne (Semana vitivinicola), en France (Agri-Mer) et en Italie (ISMEA) confirment une baisse quasi-générale des prix des vins courants en 2009. L'incidence de cette baisse sur le marché peut être amplifiée du fait de comportements d'achat de certains consommateurs diminuant la part de leurs dépenses dans les restaurants ou les débits de boisson (où les prix sont plus élevés que dans la distribution), ou abaissant la qualité des vins qu'ils achètent ou qu'ils consomment en restauration. En définitive, on peut, tout au moins en ce qui concerne les pays riches, considérer que, pour ceux dont la consommation en volume baissait tendanciellement sur une longue période (grands pays

viticoles européens notamment) cette orientation a pu s'accroître, amenant une baisse plus forte en valeur qu'en volume du fait de l'évolution des prix.

En ce qui concerne la consommation, si elle a sensiblement augmenté entre 1997 (225,1 millions d'hL) et 2007 (244,9 millions d'hL), elle stagne, voire régresse, depuis. Ce ralentissement est dû en partie à la crise économique. Ainsi, les pays traditionnellement gros producteurs et consommateurs ont accentué le rythme de la diminution de leur consommation et enregistrent, en première approche, des reculs de demande importants : -1,7 millions d'hL en Italie, -1,5 millions d'hL en Espagne, -0,9 millions d'hL en France entre 2008 et 2009.

En définitive, même si l'écart se réduit, comme le montre la Figure I-1, la production mondiale est supérieure à la consommation.

I-2 Élaboration générale du vin

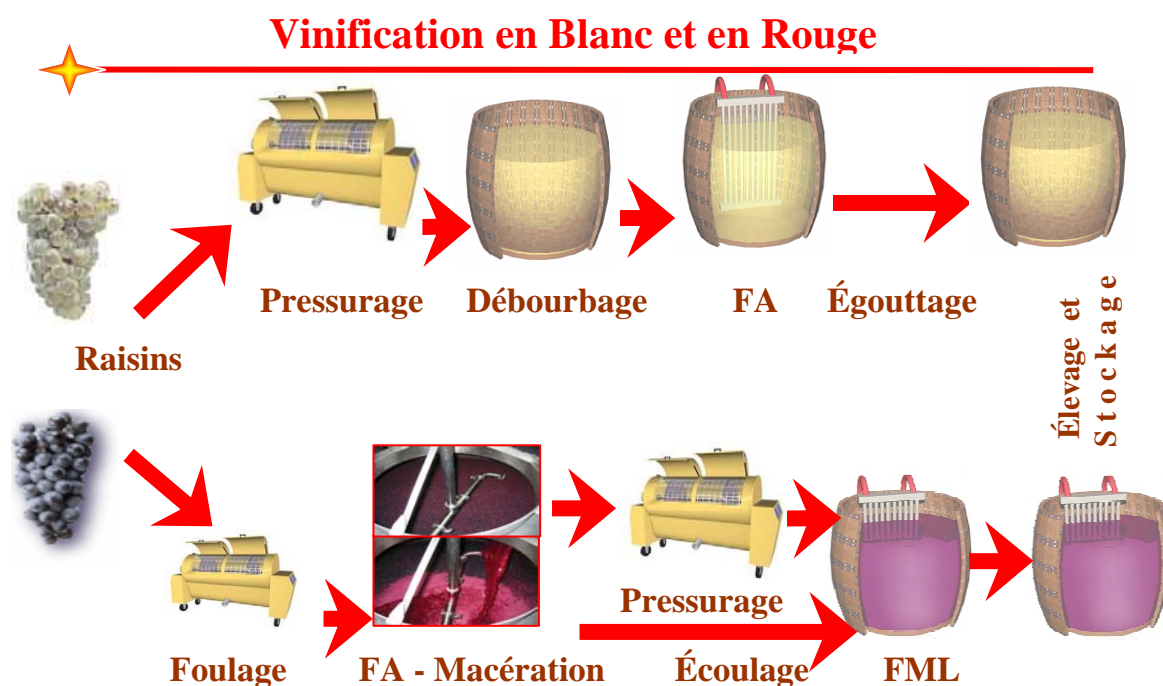


Figure I-2. Vinification en blanc et en rouge

L'élaboration du vin est l'ensemble des opérations nécessaires à la transformation du raisin en vin. Selon le type de vin (blanc, rosé ou rouge), les techniques et les étapes de vinifications ne sont pas toujours les mêmes (cf. Figure I-2). Les caractéristiques souhaitées pour le produit final déterminent le choix de certaines étapes opératoires du procédé. Pourtant, il existe des étapes élémentaires communes à toutes les vinifications. Parmi les étapes communes, on cite : la réception de la vendange, l'égrappage, le sulfitage, la cuvaison, la (FA), la fermentation malo-lactique (FML), l'écoulage, le pressurage, la clarification et la

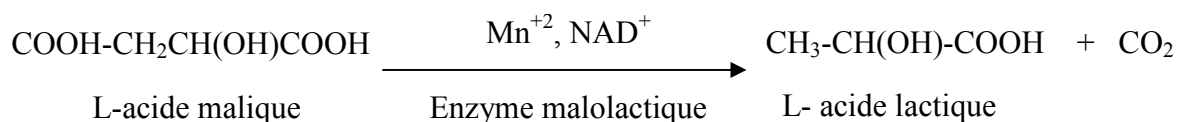
mise en bouteilles. On détaille par la suite les étapes où interviennent les micro-organismes soit : la FA et la FML.

I -2-1 La fermentation alcoolique

Le vin est défini comme “le produit obtenu exclusivement par la FA, totale ou partielle, de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisins” (Ribéreau – Gayon, 1991). Donc, la FA est l'étape clé de la vinification. Elle consiste en une transformation biologique des sucres du raisin (principalement glucose et fructose) en éthanol et dioxyde de carbone. Cette production d'alcool s'accompagne de la formation de produits secondaires tels que le glycérol, l'acide acétique, l'acide succinique, les alcools supérieurs, les esters... (Swiegers et al., 2005). La FA du vin est assurée soit par des levures présentes naturellement sur la baie du raisin ou dans le chai de vinification (non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*), soit par des levures d'origine exogène, par exemple des levures sèches actives, ajoutées en début ou au cours de la FA. Actuellement, la mise en œuvre de la FA utilise souvent des levains, disponibles sur le marché, de souches de *S. cerevisiae* sélectionnées pour leur aptitude fermentaire et leur contribution aromatique. Quelle que soit la méthodologie choisie, la FA doit être rapide. La multiplication des levures dans le vin doit être suffisante pour assurer la FA efficace des sucres et pour limiter le développement des autres micro-organismes, notamment celui des levures indésirables ou des bactéries lactiques et acétiques. La FA peut durer de quelques jours (dans la majorité des cas en vinification en rouge) à plusieurs semaines (notamment en blanc) en fonction de la région et du type de vin recherché. L'utilisation de levains commerciaux n'est pas toujours satisfaisante pour assurer un bon déroulement de la FA. Il est possible de rencontrer des échecs d'inoculation et des fins de FA languissantes. Ces dernières concernent également les fermentations indigènes. La plupart des explications proposées à ces problèmes fermentaires reposent sur les caractéristiques physico-chimiques du moût, concentration en sucres fermentescibles, teneur en azote assimilable, carence en vitamines, et les conditions de mise en œuvre comme la limitation en oxygène ou la mauvaise gestion de la température...

I-2-2 La fermentation malolactique

La FML désigne la désacidification biologique du vin sous l'action des bactéries lactiques. Elle consiste en une décarboxylation enzymatique de l'acide L-malique plus agressif en acide L-lactique plus doux selon la réaction suivante :



Les bactéries malolactiques proviennent des raisins, des matériels de transport et surtout du processus de vinification. Elles appartiennent aux genres suivants : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Ænococcus* (Lonvaud-Funel, 1991 ; 1999). Mais, en général, seules les souches appartenant au dernier genre peuvent survivre et effectuer complètement la FML dans le vin tandis que les autres disparaissent très vite après la FA. La FML s'impose pour l'ensemble des vins rouges puisqu'elle confère une souplesse, une rondeur et une stabilité microbiologique pour les vins. Concernant les vins blancs, la FML est recherchée en zone septentrionale et est plus rare en zone plus chaude. La FML peut durer pendant quelques semaines, même plusieurs mois, selon les types de vin recherché. En effet, la FML améliore la qualité du vin, non seulement par la désacidification mais aussi par d'autres transformations qui changent les caractères organoleptiques du vin (Nielsen et Richelieu, 1999). L'activité des bactéries lactiques de la FML touche aussi d'autres réactions comme la dégradation de l'acide citrique, la transformation des acides aminés, la production de composés volatils, d'agents antibactériens comme l'acide lactique, l'acide acétique et parfois des bactériocines, ou encore d'amines biogènes. La FML assure ainsi un caractère organoleptique plus complexe. Maicas et al., en 1999, ont prouvé que les composés volatils (des alcools supérieurs comme le 2-3 butanediol, des esters, des acides et des composés cétoniques comme le diacétyle et l'acétoïne) des vins inoculés par des levains malolactiques d'*O. æni* ont été significativement augmentés, modifiant les caractères organoleptiques et la qualité du vin. L'augmentation de la concentration d'esters d'éthyle dans le vin pendant la FML, y compris l'acétate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle, le lactate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle, et aussi les diminutions de quelques esters ont été observée (de Revel et al., 1999; Delaquis et al., 2000 et Gambaro et al., 2001). La FML affecte l'acidité totale, le pH et la sensation acide du vin : l'acidité totale diminue d'environ 1,5 à 4,6 g/L (acide tartrique/L) et le pH augmente de 0,1 à 0,3 point (Krieger et al., 2000). A coté de la FML bactérienne, il faut noter que, dans les conditions de la vinification, les levures *S. cerevisiae* et certaines non-*Saccharomyces*, particulièrement *Schizosaccharomyces*, peuvent consommer partiellement ou totalement l'acide malique du vin (Taillandier et al., 1995).

I-3 Métabolisme des levures

Généralement, les levures *S. cerevisiae* sont les acteurs indispensables pour la FA du vin puisqu'elles sont capables de transformer totalement les sucres du moût de raisin en éthanol, dioxyde de carbone et des centaines de produits secondaires. De plus, elles sont très tolérantes et résistantes aux conditions difficiles du vin, comme l'acidité très haute, le pH très faible, les concentrations élevées en SO₂ et éthanol... Le mécanisme de la FA et les facteurs influençant la FA sont résumés dans les parties suivantes (I.3.1 et I.3.2).

I-3-1 Le mécanisme de la FA

I-3-1-1 La glycolyse

La glycolyse est le point de départ du métabolisme des sucres que ce soit par fermentation ou par respiration. En général, la glycolyse permet de dégrader le glucose ou le fructose en acide pyruvique (cf. Figure I-3) en mettant en jeu une chaîne de 9 réactions enzymatiques qui se produisent successivement dans la cellule. Du point de vue énergétique, une molécule de glucose ou fructose dégradée amène à la formation de 4 molécules d'ATP dont 2 molécules sont consommées pendant la première et la troisième réaction de la glycolyse. Il y a donc un gain de 2 molécules d'ATP pour une molécule de sucre métabolisée. De plus, 2 molécules de NADH,H^+ sont formées et doivent subir une réoxydation.

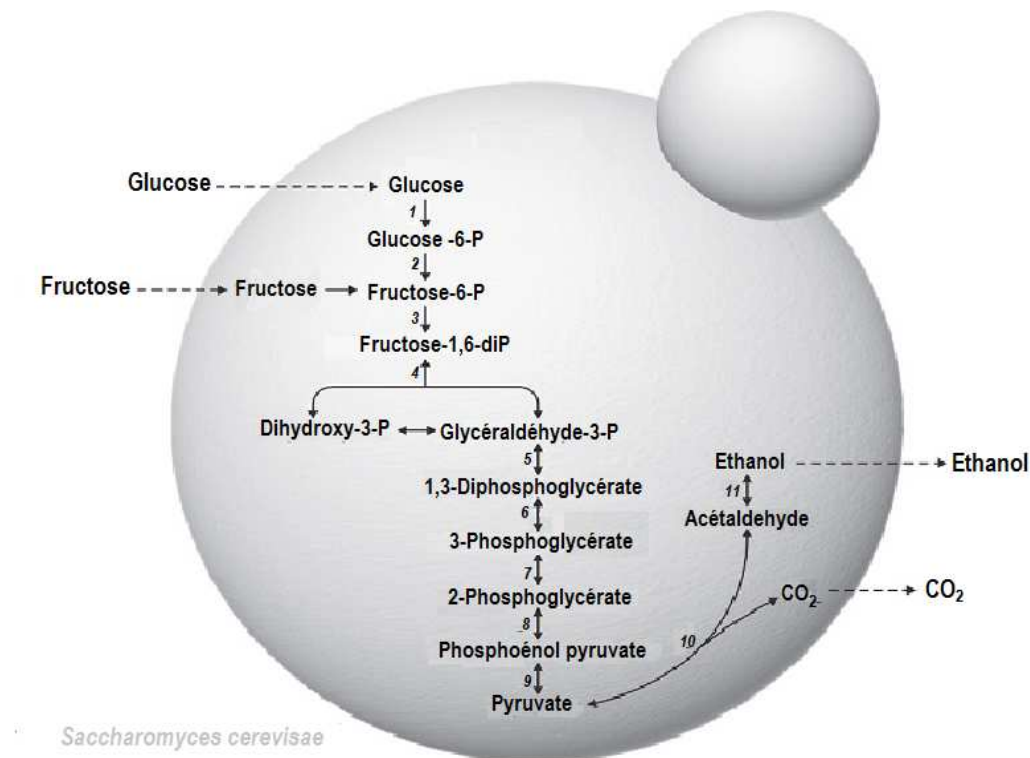


Figure I-3. Schéma de la glycolyse d'Embden-Meyerhof-Parnas et la FA chez *S. cerevisiae*

(Enzymes pour les réactions du schéma : 1, hexokinase; 2, phosphoglucose isomérase; 3, phosphofruktokinase; 4, aldolase; 5, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; 6, phosphoglycérate kinase; 7, phosphoglycéro mutase; 8, enolase; 9, pyruvate kinase; 10, pyruvate décarboxylase; 11, alcool déshydrogénase)

En aérobiose (respiration), l'acide pyruvique est oxydé en eau et en CO₂ ou en précurseurs pour les réactions d'anabolisme grâce à l'activation du cycle de Krebs. En anaérobiose, le pyruvate subit une décarboxylation, donnant ainsi de l'éthanal (acétaldéhyde) qui en acceptant les deux atomes d'hydrogène provenant du NADH, H⁺ est réduit en éthanol.

I-3-1-2 La fermentation alcoolique

En œnologie, les levures *S. cerevisiae* fermentent des taux de sucres d'environ 200 - 220 g/L dans les moûts de raisin pour produire 10 - 13 %v/v d'éthanol en fin de FA. Le pyruvate est aussi à l'origine de diverses réactions de transformation conduisant à une grande variété de produits secondaires. Ces substances produites par des voies métaboliques différentes joueront un rôle très important sur la qualité du vin produit (glycérol, acétaldéhyde, acides organiques, alcools supérieurs, esters.... (cf. Figure I-5). Cependant, avant d'examiner les voies de production de ces produits secondaires, rappelons que les voies métaboliques des levures sont largement contrôlées par la teneur en sucre et en oxygène dans le moût de raisin. Ces mécanismes de régulation sont connus sous le nom d'effet Pasteur et d'effet Crabtree.

L'effet Pasteur

Cet effet a été découvert en 1857 par Louis Pasteur, qui a constaté qu'en aérant un bouillon de levure *S. cerevisiae* où les concentrations en sucre étaient faibles (inférieure à 2 g/L), on provoquait une augmentation du développement des levures et une diminution de la production d'alcool par la FA. Pasteur en déduit que la « respiration » inhibe la FA.

L'effet Crabtree

Découvert en 1923 par Crabtree, cet effet exprime une tendance au gaspillage du substrat carboné (glucose par exemple) quand ce substrat est présent en grandes quantités (à partir de 2 g/l). Par exemple, dans le moût de raisin, *S. cerevisiae* ne métabolise les sucres que par la voie fermentaire. La respiration est inhibée même en présence d'oxygène. Ce phénomène est appelé l'effet Crabtree, ou répression catabolique par le glucose, ou encore contre-effet Pasteur. Le niveau de sensibilité est variable selon le type de levure considéré. Certaines levures, telles que *S. cerevisiae*, sont fortement Crabtree positives et produisent déjà de l'éthanol au-delà de 1 g/L de glucose tandis que celles pour lesquelles la respiration n'est pas réprimée par la présence de glucose sont dites Crabtree négatives comme *T. delbrueckii* (cf. Tableau I-1).

Tableau I-1. Catégories physiologiques des levures du vin (Lagunas, 1981).

<i>Mode de FA</i>	
<i>Crabtree-positif</i>	<i>Crabtree-négatif</i>
Saccharomyces cerevisiae	Hanseniaspora uvarum
Zygosaccharomyces bailii	Pichia anomala
Brettanomyces intermedius	Candida utilis
Torulopsis glabrata	Hansenula neofermentans
Schizosaccharomyces pombe	Kluyveromyces marxianus
Hanseniaspora guilliermondii	Debaryomyces hansenii
Candida stellata	Torulaspota delbrueckii

Selon ces auteurs *Torulaspota* serait donc considérée comme une levure Crabtree négative. Cependant ce point de vue n'est pas unanime : Alves-Araujo et al. (2007) et Merico et al. (2007) affirment le contraire. Ces derniers auteurs rapportent qu'elle serait Crabtree Positive mais avec une sensibilité au glucose moins grande que *Saccharomyces*.

I-3-1-3 La production de glycérol (cf. Figure I-4)

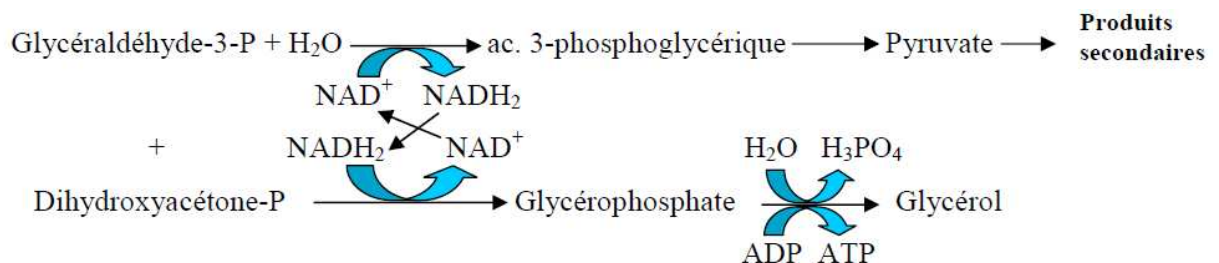


Figure I-4. Schéma de la fermentation glycéropyruvique

Au début de la FA, afin de permettre l'oxydation du 3-phospho-glycéraldéhyde, qui conduira à l'acide pyruvique, la réduction de la dihydroxy-acétone phosphate se traduit par la production de glycérol (Neuberg, 1946). Le métabolisme du glycérol par des levures joue plusieurs rôles importants pendant la FA anaérobie des sucres : synthèse des phospholipides, maintien de la balance redox de la cellule et protection contre un choc osmotique élevé (Pronk et al., 1996). En moyenne, 8 % des sucres suivent la fermentation glycéropyruvique (contre 92 % pour la FA) ce qui correspond à une gamme de 6 à 14 g/L. Même si la plupart de glycérol du vin est produit dans les premiers temps de la FA., on observe une production lente

et continue jusqu'à la fin de FA. Le glycérol est un polyol inodore, incolore et légèrement sucré, jouant un rôle important dans la structure et le « gras » du vin (Noble et al., 1984).

I-3-2 Les arômes fermentaires du vin

L'arôme des vins est classiquement défini comme la résultante de quatre composantes correspondant à autant d'étapes de la vinification. Selon leur origine on distingue :

- arôme variétal provenant directement du raisin,
- arôme pré fermentaire qui se forme au cours des étapes que subit la vendange entre la récolte et le début de la FA,
- arôme fermentaire issu du métabolisme des levures et/ou des bactéries en cas d'une FML,
- arôme de vieillissement qui se forme par des réactions chimiques ou physico-chimiques au cours de l'élevage et du vieillissement du vin (Swiegers et Pretorius, 2005).

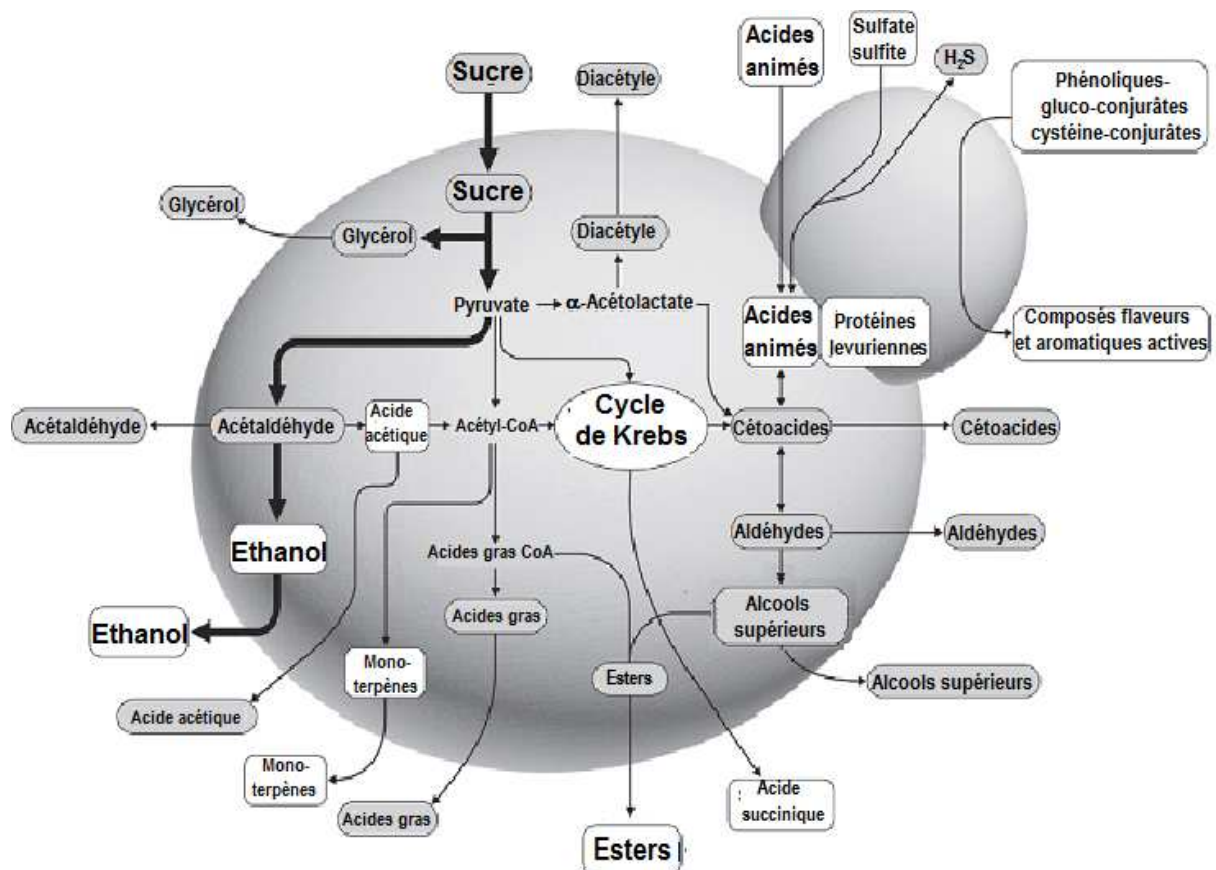


Figure I-5. Schéma de la synthèse des composés aromatiques à partir du métabolisme des sucres, acides aminés et sulfures (Swiegers et al., 2005)

Les recherches dans le domaine des arômes des vins ont porté leurs différentes composantes. Si l'arôme variétal est responsable en grande partie de la typicité du vin la levure de la FA joue aussi un grand rôle puisqu'elle est responsable de la note vineuse qui constitue la base aromatique commune à tous les vins. Autour de cette note vont intervenir divers harmoniques qui feront la subtilité de l'arôme d'un bon vin. De plus, les constituants volatils issus de la FA représentent quantitativement la majeure partie des constituants de l'arôme. En conséquence, le vin a plus d'arômes désirables que le raisin. Plusieurs voies métaboliques des levures (cf. Figure I-5) et bactéries malolactiques sont concernées dans la formation des arômes du vin. Elles participent, d'une part, à la synthèse des nouveaux composés aromatiques à partir des substances du moût de raisin, et d'autre part à la transformation des précurseurs moins sensoriels du moût de raisin en structures plus aromatiques ou à la dégradation des composés naturels olfactivement indésirables en éléments neutres. La synthèse des nouveaux arômes est souvent réalisée dans les cellules de levures ou de bactéries grâce aux enzymes intercellulaires comme des alcools acétyl transférase pour produire des esters acétates... Alors que, la transformation ou la dégradation des structures naturelles moins aromatiques ou des arômes indésirables a lieu grâce aux enzymes extracellulaires comme des glucosidases pour libérer des alcools terpéniques (linanol et nérol) ou des sulfite réductases pour réduire le H₂S (Strauss et al., 2001)... Il a été démontré que les activités enzymatiques des levures *Saccharomyces* renforcent les arômes variétaux de type terpènes et les notes thiolées contribuant à la révélation du potentiel aromatique des vins d'un terroir donné (Dubourdiou et al., 2000).

La perception des arômes (désirables ou non désirables) dans le vin est reliée directement à leurs concentrations dans le vin. La concentration finale de ces arômes dépend de plusieurs facteurs : les espèces des levures et bactéries proliférant pendant la vinification, le procédé de maturation, le procédé de finition du vin, la filtration du vin, la mise en bouteille et le type de bouchonnage... (Bartowsky et Pretorius, 2009). Les composés aromatiques actifs du vin sont groupés suivant leurs structures chimiques en acides volatils, alcools supérieurs, esters, et carbonyles.

1-3-2-1 La formation des acides volatils

Les différents composés qui contribuent à l'acidité totale sont les acides organiques initialement présents dans le moût de raisin (malique, tartrique et citrique) et ceux formés par les fermentations (succinique, lactique, acétique, propionique, 2-méthyle propionique, butanoïque...). Les acides présents dans le moût du raisin ne sont pas volatils, et ils participent principalement à l'acidité et à la stabilité physique, biochimique et microbiologique du vin. Par contre, les acides originaires des fermentations, avec des concentrations de 500 - 1000 mg/L, sont volatils et aromatiques. Même si ils équivalent

seulement à 10 – 15 % des acides totaux du vin ils contribuent significativement à sa qualité sensorielle (Radler, 1993 ; Erasmus et al., 2004).

Les acides volatils regroupent les acides à courte chaîne de carbone, dont l'acide acétique qui représente 90 % des acides volatils et joue un rôle organoleptique très important dans le vin. Cet acide acétique peut provenir de l'acide pyruvique selon deux voies différentes (cf. Figure I-6). La première est l'hydrolyse de l'acétyl-CoA issu de la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique par le complexe pyruvate déshydrogénase, mais cette réaction qui se déroule dans les mitochondries est limitée en anaérobiose. La deuxième voie consiste en une oxydation de l'acétaldéhyde par l'aldéhyde déshydrogénase dont le cofacteur est le NADP⁺ et qui est très active pendant la FA. Cette voie sert à former de l'acétyl Co-A grâce à l'acétyl-CoA synthétase, lorsque la pyruvate déshydrogénase est réprimée.

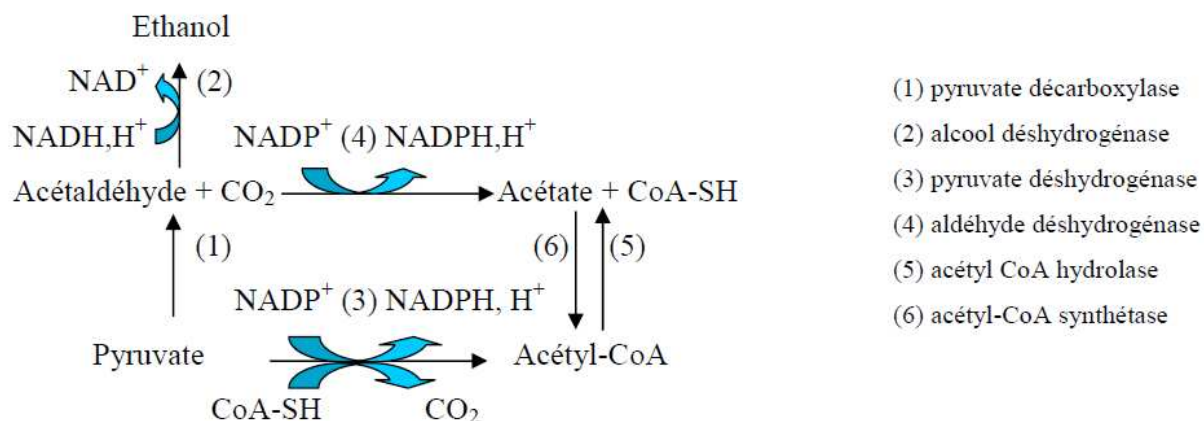
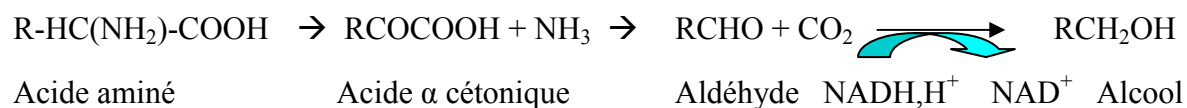


Figure I-6. La formation de l'acide d'acétique

La production de l'acide acétique dans le vin dépend de la souche de levure, de l'aération et de la concentration des sucres dans le moût de raisin (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Dès 1983, Lafon-Lafourcade et al., ont démontré que la teneur en acide acétique augmentait de 0,26 g/L à 1,12 g/l dans les vins issus des moûts de raisin ayant une concentration initiale en sucres de 224 g/L et 348 g/L, respectivement. La production de l'acide acétique varie selon que la FA est réalisée par une seule espèce de levures ou par des espèces différentes. Avec des moûts de concentration initiale élevée en sucres, Bely et al. (2008) ont montré que *Torulasporea* produisait des teneurs en acide acétique inférieures à celles produites par *Saccharomyces*. En conséquence, ces auteurs proposent l'utilisation de cultures mixtes de ces levures pour diminuer la production de l'acide acétique lors de la vinification de moûts riches en sucre.

I-3-2-2 La formation des alcools supérieurs

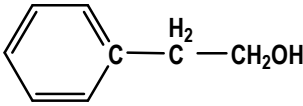
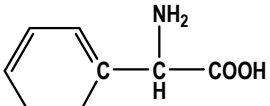
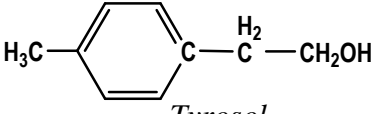
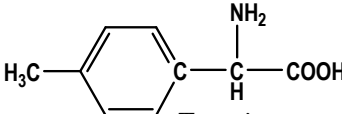
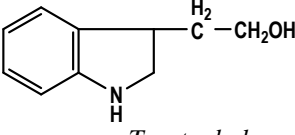
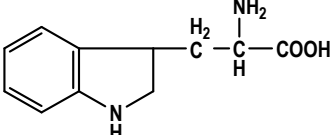
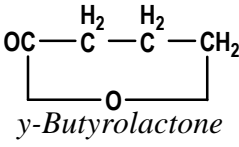
Les alcools supérieurs connus aussi sous le nom d'alcools de fusel contiennent au moins 2 atomes de carbone dans leurs molécules. Ils proviennent du métabolisme des sucres et des acides aminés par la levure (cf. Figure I-5 et Tableau I-3). La voie principale de synthèse est liée à la désamination des acides aminés dans les levures par la voie d'Ehrlich selon les réactions suivantes :



La désamination en acide α -cétonique est suivie par une décarboxylation pour former un aldéhyde. Enfin, l'aldéhyde est réduit en alcool. Les alcools amylique et isoamylique qui sont les plus présents dans le vin, proviennent respectivement du métabolisme de la leucine et de l'isoleucine. La valine peut être métabolisée en alcool isobutylique (2-méthyl-propan-1-ol). L'alcool phényléthanol provient du métabolisme de la phénylalanine (cf. Tableau I-2) tandis que le propan-1-ol provient de l' α -cétobutyrate qui peut être formé à partir du pyruvate de l'acétyl-CoA.

Ces alcools supérieurs peuvent avoir des impacts positifs ou négatifs sur les arômes du vin. A un niveau de concentration faible (moins de 300 mg/L), ils contribuent au caractère floral ou fruité du vin, par exemple l'arôme de rose du au phényléthanol. Mais, si leurs concentrations dépassent 400 mg/l, il y a des risques de perception négative, comme par exemple dans le cas des alcools isoamyliques et 2-méthyle propal-1-ol (cf. Tableau I-3) (Lambrechts et Pretorius, 2000 et Swiegers et Pretorius, 2005). La production des alcools supérieurs du vin dépend de la souche de levures, de la concentration des acides aminés précurseurs et de l'oxygène dissous du moût de raisins (Cabrera et al., 1998). Giudici et al., (1990) ont constaté que l'usage de différentes souches de *S. cerevisiae* pendant la FA contribuait considérablement aux variations des profils des alcools supérieurs dans le vin. Aussi en comparaison avec la FA par *S. cerevisiae* seule, l'utilisation de cultures mixtes de levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* comme *Pichia fermentans* conduit à une amélioration de la production des alcools supérieurs dans le vin : 1-propanol, n-butanol et 1-hexanol (Clemente et al., 2005). Pour Nissen et al., (2003) également les concentrations en alcools amylique et isoamylique, en isobutanol en n-propanol sont plus élevées dans les cultures mixtes de *S. cerevisiae*, *K. apicula* et *C. pulcherrima* que dans leurs cultures pures.

Tableau I-2. Les principaux alcools supérieurs du vin et les acides aminés pouvant en être les précurseurs (Ribéreau-Gayon et al., 2006)

Alcool supérieur	Descripteur aromatique	Conc. mg/L et (seuil aromatique mg/L) dans le vin	Acide aminé précurseur
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \end{array}$ <p>3-méthyl-butan-1-ol ou alcool isoamylique</p>	Vernis Frangipane	80 - 300 (65)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$ <p>Leucine</p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$ <p>2-méthyl-butan-1-ol ou alcool isoamylique actif</p>	Vernis, âpre	30 - 100 (30)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ <p>isoleucine</p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>2-méthyl-propan-1-ol</p>	Fusel, spiritueux	50 - 150 (40)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ <p>Valine</p>
 <p>Phényléthanol</p>	Floral, rose	10 - 100 (10)	 <p>Phénylalanine</p>
 <p>Tyrosol</p>	Amère ou âpre chimique	20 - 50	 <p>Tyrosine</p>
 <p>Tryptophol</p>	Amande, solvant	0 - 1	 <p>Tryptophane</p>
 <p>γ-Butyrolactone</p>	Vernis ou époxy	0 - 5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$ <p>Acide glutamique</p>
$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Méthionol</p>	Chou-fleur, chou	0 - 5 (0,5)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$ <p>Méthionine</p>

I-3-2-3 La formation des esters

Les esters, produits secondaires de la FA, jouent un rôle important dans le profil aromatique du vin. Ils sont généralement formés dans la cellule des levures par les combinaisons des acides organiques ou des acides gras avec le CoA et les alcools, en présence d'enzymes spécifiques comme les alcools acétyltransférases (cf. Figure I-5).

Dans le vin, la concentration totale des esters, excepté l'acétate d'éthyle, n'est que de quelques dizaines mg/L. Ils jouent cependant un rôle très important dans le bouquet final du vin puisque dans la plupart des cas, ces esters sont présents à une concentration supérieure à leur seuil aromatique (cf. Tableau I-3). Les esters sont généralement groupés en 2 catégories : les esters d'éthyle et les esters acétates. Les esters d'éthyle comprennent le butanoate d'éthyle (floral, fruité), l'hexanoate d'éthyle (pomme fraîche), l'octanoate d'éthyle (ananas, poire), le décanoate d'éthyle (floral, savon), le propanoate d'éthyle (fruité), le 3-Méthyl-butanoate d'éthyle et le lactate d'éthyle (fraise)... (cf. Tableau I-3). Les esters d'acétates regroupent l'acétate d'éthyle (solvant, vernis, fruité, acide), l'acétate d'isoamyle (banane, poire), l'acétate de 2-Phényléthyl (rose, miel, fruité), l'acétate d'isobutyle (banane, fruité), l'acétate d'hexyle (sucré, parfume), l'acétate de 2-Méthyl propyle (banane, fruité), l'acétate de 2-Méthyl butyle (banane, fruité), l'acétate de 3-Méthyl butyle (banane) et l'acétate de 2-Phényléthyl (fleur)... (cf. Tableau I-3). La concentration optimale de l'acétate d'éthyle dans le vin est d'environ 70 mg/L, au-delà de 150 mg/L, on observe des effets négatifs sur le profil aromatique du vin (i.e. l'odeur de solvant ou de vernis). La concentration de l'acétate d'isoamyle ne devrait pas dépasser 5,3 mg/L (Radler et al., 1993). Dans *S. cerevisiae*, l'alcool acétyltransférase (AATase), codée par le gène ATF1, est l'une des enzymes les plus importantes pour la formation des esters acétates : acétate d'éthyle, acétate d'hexyle, acétate d'isoamyle et acétate de 2-phényléthyle... (Yoshioka et Hashimoto, 1981 et Fujii et al., 1994). Cette enzyme réagit avec les coenzymes A des acides gras et des alcools, avec des degrés d'affinité différents. Le gène ATF1 serait fortement reprimé par des conditions très aérobies et par l'addition des acides gras dans le milieu (Lilly et al., 2000). Dans les levures non-*Saccharomyces*, par exemple *Hansenula mrakii*, un rôle similaire de l'AATase dans la production de l'acétate d'isoamyle dans la FA de Saké a été décrite par Inoue et al., (1997). Au final, la formation des esters du vin dépend de la balance entre les enzymes de synthèse (AATase) et celles de dégradation (estérase) des esters. Cette formation nette est importante pour le profil flaveur général du vin (Verstrepen et al., 2003 et Lilly et al., 2006).

Tableau I-3. Composés aromatiques dans le vin (Swiegers et al., 2005 et Francis et Newton, 2005)

<i>Composé</i>	<i>Descripteurs aromatiques</i>	<i>Dans le vin</i>	<i>Seuil aromatique</i>	<i>Composé</i>	<i>Descripteur aromatique</i>	<i>Dans le vin</i>	<i>Seuil aromatique</i>
Esters d'éthyle				Polyols			
Butanoate d'éthyle	Floral, fruité	0,01–1,8 mg/L	0,02 mg/L ^a	Glycérol	inodore (goût sucré léger)	5-14 g/L	5,2 g/L ^b
Hexanoate d'éthyle	Pomme fraîche	0,03–3,4 mg/L	0,05 mg/L ^a	Mannitol	Sucré		
Octanoate d'éthyle	Ananas, poire	0,05–3,8 mg/L	0,02 mg/L ^a	Erythritol	Sucré		
Decanoate d'éthyle	Floral, savon	0–2,1 mg/L	0,2 mg/L ^c	Carbonyles			
Propanoate d'éthyle	Fruité		1,8 mg/L	Acétaldéhyde	Pomme grillé, noisette	10–75 mg/L	100 mg/L
2-Méthyl propanoate d'éthyle	Fruité		15 µg/L	Diacétyle	Beure	<5 mg/L	2,8 mg/L ^c
2-Méthyl butanoate d'éthyle	Fruit sucré		1 µg/L	Acétoïne	Beure, crème	0,6-253 mg/L	150 mg/L
3-Méthyl butanoate d'éthyle	Fruit		3 mg/L	Monoterpènes			
Lactate d'éthyle	fraise		14 mg/L	Linalol	Rose	0,002-0,01 mg/L	0,025 mg/L ^c
2,3dihydrocinnamate d'éthyle	Fleur, fruité	0,21–3,0 mg/L	1,6 mg/L	Géranol	Goût de rose	0,001-0,044 mg/L	30 mg/L ^a
Cinnamate d'éthyle	miel, cannelle	0,1–8,9 mg/L	1,1 mg/L	Citronellol	Citronnelle	0,015-0,042 mg/L	100 mg/L ^a
Anthranilate méthyl	Fruité, raisin			Phénols			

Anthranilate d'éthyl	Fruit, sucré			4-Ethylphénol	Médicinal,	0,012-6,5 mg/L	0,6 mg/L ^c
Acétates				4-Ethylguaïacol	Phénolique, sucré	0,001-0,44 mg/L	0,11 mg/L ^c
Acétate d'éthyle	Solvant, vernis fruité, acide	22,5–63,5 mg/L	7,5 mg/L ^a	4-Vinylphénol	Pharmaceutique	0,04-0,45 mg/L	0,02 mg/L ^f
				4-Vinylguaïacol	Goût d'ail, phénolique	0,0014-0,71 mg/L	10 mg/L ^f
Acétate d'isoamyle	Banane, poire	0,1–3,4 mg/L	0,03 mg/L ^a	Acides			
Acétate de 2- Phényléthyl	Fleur, rose, miel, fruité	0–18,5 mg/L	0,25 mg/L ^a	Acide acétique	Acidité volatile, vinaigre	110-1150 mg/L	280 mg/L ^a
				Ac ; propanoïque	Vinaigre		8,1 mg/L
Acétate d'isobutyl	Banane, fruité	0,01–1,6 mg/L	1,6 mg/L ^d	Acide 2-Méthyl propanoïque	Fromage, rance		200 g/L
Acétate d'hexyl	Sucré, parfum	0–4,8 mg/L	0,7 mg/L ^b	Acide butanoïque	Fromage, rance		2,2 mg/L
Acétate de 2-Méthyl propyl	Banane, fruité		1,6 mg/L	Acide 2-Méthyl butanoïque	Fromage, sucré		3 mg/L
Acétate de 2-Méthyl butyl	Banane, fruité		0,160 mg/L	Acide 3-Méthyl butanoïque	Fromage bleu		3 mg/L
Acétate de 3-Méthyl butyl	Banane		30 µg/L	Acide hexanoïque	Fromage, sucré		8 mg/L
Acétate de 2- Phényléthyl	Fleur		0,25 mg/L	Acide octanoïque	Fromage, rance		8,8 mg/L
Sulfure d'hydrogène	Œuf pourri	Trace à 80 µg/L	10 - 80 µg/L	Acide 3- propionique	Chocolat, rôti		

Dont : Seuils déterminées : a dans l'éthanol 10 % ; b dans le vin ; c dans le vin rouge ; d dans la bière et e dans le vin synthétique

La biogénèse des esters éthyliques et des acétates pendant la FA est sous la dépendance des métabolismes lipidiques et azotés. Les conditions de fermentations sont très importantes pour la production des esters éthyliques. Des conditions anaérobies strictes, des températures de FA basses et une clarification des moûts importante mais permettant la présence suffisante de bourbes résiduelles sont les facteurs les plus favorables à la formation des esters éthyliques

(Schneider, 1998, Ribéreau-Gayon et al., 2006). Les concentrations des esters diffèrent d'une levure à l'autre, d'un cépage à l'autre et même d'une année à l'autre pour la même levure et le même cépage... (Lambrechts et Pretorius, 2000 ; Marais, 2001 et Renault et al., 2009). Les souches commerciales *S. cerevisiae* produisent des concentrations variables d'esters. Les souches non-*Saccharomyces* : *Candida*, *Kluyveromyces* et *Torulaspora*... produisent plus d'esters que *Saccharomyces* (Ciani et al., 1998). Par ailleurs, la méthode d'inoculation des levures a aussi un impact sur la production des esters dans le vin. Les FA mixtes des *H. guilliermondii* and *P. anomala* avec *S. cerevisiae* ont montré une augmentation des concentrations des esters acétates, comparées avec les FA pures de *Saccharomyces* (Rojas et al., 2003) alors que, l'ensemencement séquentiel des *T. delbrueckii* avec *S. cerevisiae* améliore la production des esters du vin (Languet et al., 2005 et Pillet et al., 2010).

I-3-2-4 La formation des carbonyles

Les carbonyles sont des aldéhydes et des cétones. Dans le vin, l'acétaldéhyde, l'acétoïne et le diacétyl (2,3-butanedione) ont des impacts marqués sur la qualité organoleptique. L'acétaldéhyde est issu de la décarboxylation de l'acide pyruvique (cf. Figure I-4). et sa réduction en éthanol est cruciale pour maintenir la balance redox dans la levure (Pronk et al., 1996). Il est le plus important carbonyle du vin (10 - 75 mg/L). Sa description aromatique est la pomme caramélisée et la noisette. Sa présence dans le vin blanc est une indication d'oxydation mais il contribue à la complexité aromatique du vin rouge, à condition d'être inférieur à 100 mg/L. Le diacétyl est produit au début de la FA par la décarboxylation enzymatique de α -acétolactate mais il est rapidement réduit en acétoïne et 2,3-Butaldiol. Cette réduction se poursuit d'ailleurs dans les jours qui suivent l'achèvement de la FA lorsque les vins sont conservés sur biomasse levurienne (de Revel et al., 1995). L'acétoïne et surtout le diacétyl (0,2 - 0,3 mg/L dans le vin) sont des composés odorants évoquant l'arôme du beurre. Au-delà d'une concentration de 4 mg/L, le diacétyl intervient négativement sur l'arôme du vin.

I-3-3 Les levures œnologiques

I-3-3-1 Taxonomies des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*

Taxonomie des levures Saccharomyces

Classification des *Saccharomyces*: Règne Fungi, Division *Ascomycota*, Sous-division *Saccharomycotina*, Classe *Saccharomycetes*, Ordre *Saccharomycetales* et Famille *Saccharomycetaceae*. Les *Saccharomyces* sont utilisées pour la fabrication du pain depuis plus de 3000 ans. Mais ce n'est qu'entre 1857 et 1863 que Louis Pasteur démontre le rôle de la levure en tant que micro-organisme responsable de la FA. La liste d'espèces de *Saccharomyces* selon ITIS (en anglais : the Integrated Taxonomic Information System) est présentée dans le Tableau I-4:

Tableau I-4. Les levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*

<i>Saccharomyces</i>	<i>Non-Saccharomyces</i>
<i>Saccharomyces bailii</i> Linder	<i>Brettanomyces</i> / Anamorph.
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Hansen, 1908 Syn.	<i>Dekkera</i>
<i>Saccharomyces uvarum</i>	<i>Candida</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, 1883	<i>Cryptococcus</i>
<i>Saccharomyces delbrueckii</i> Linder	<i>Debaromyces</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i> Hansen	<i>Hanseniaspora</i> / Anamorph.
<i>Saccharomyces fermentati</i> (Saito) Lodder & Kreger-van Rij	<i>Kloeckera</i>
<i>Saccharomyces florentinus</i> (Cast.) Lodder & Kreger-van Rij	<i>Hansenula</i>
<i>Saccharomyces fragilis</i> Jorgensen	<i>Kluyveromyces</i>
<i>Saccharomyces fructuum</i> Lodder & Kreger-van Rij	<i>Torulaspora</i>
<i>Saccharomyces heterogenicus</i> Osterwalder	<i>Metschnikowia</i>
<i>Saccharomyces oleaginosus</i> Santa Maria	<i>Pichia</i>
<i>Saccharomyces rosei</i> (Guill.) Lodder & Kreger-van Rij	<i>Rhodotorula</i>
<i>Saccharomyces steineri</i> Lodder & Kreger-van Rij	<i>Saccharomycodes</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i> et <i>Saccharomyces kefir</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>

Taxonomie des levures non-Saccharomyces

Les levures qui ne sont pas classées dans le genre *Saccharomyces* sont nommées non-*Saccharomyces*. Les genres de non-*Saccharomyces* les plus fréquemment rencontrés en

œnologie sont : *Torulaspota*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* et *Brettanomyces*... (cf. Tableau I-4).

Taxonomie des levures T. delbrueckii

Torulaspota delbrueckii appartient au: Règne Fungi, Division *Ascomycota*, Sous-division *Saccharomycotina*, Classe *Saccharomycetes*, Ordre *Saccharomycetales*, Famille *Saccharomycetaceae*, Genre *Torulaspota* et Espèce *delbrueckii*. Le genre *Torulaspota* a été défini en 1895 par Lindner. Ce genre a été incorporé entre le genre *Saccharomyces* et le genre *Zygosaccharomyces* en 1952 par Lodder et Kreger-van Rij, et ensuite redéfini en 1975 par van der Walt et Johannsen. Donc, l'histoire de *Torulaspota* explique sa relation étroite avec *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces*. James et al., (1996) par l'analyse des séquences de la région ITS entre les gènes rARN 18s et 28s, ont montré que *Torulaspota* peut être insérée dans deux espèces de *Zygosaccharomyces* (*Z. mrakii* et *Z. microellipsoides*). Enfin, Oda et al., (1997) ont réexaminé les souches de levures classées précédemment comme *T. delbrueckii* en utilisant la PCR-RAPD. Ils ont reclassé les souches types *T. delbrueckii* dans le genre de *Torulaspota*. Ce genre est composé aussi de *T. globosa* et de *T. pretoriensis*.

I-3-3-2 Morphologies des levures Saccharomyces et non-Saccharomyces

Les grosses cellules de *S. cerevisiae* ont différentes formes allant de rondes à ovoïdes de 6 à 12 μm de longueur et de 6 à 8 μm de largeur, présentant des bourgeonnements multilatéraux tandis que les cellules de *T. delbrueckii* sont légèrement plus rondes que celles de *S. cerevisiae* (cf. Figure I-7, Pillet et al., 2010).

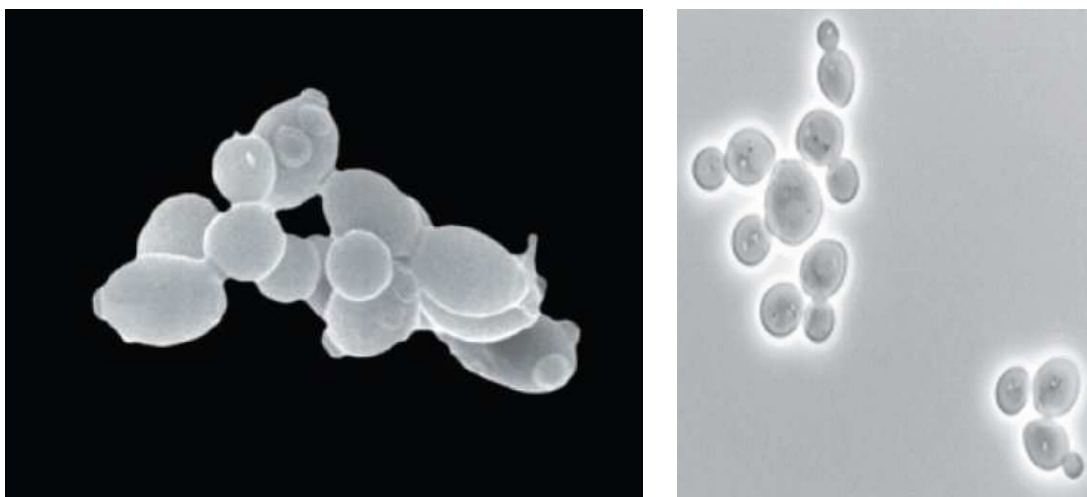


Figure I-7. L'image microscopique de *S. cerevisiae* (à gauche) et *T. delbrueckii* (à droite).

Cependant, il est difficile de distinguer les *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* sous microscope en se basant seulement sur leurs morphologies cellulaires. Des techniques plus sophistiquées et complexes sont nécessaires pour les distinguer comme la mise en œuvre de milieux sélectifs, les finger printings des ADN ou la technique de PCR-RFLP de la région ITS de rADN (Ocón et al., 2010).

I-3-3-3 Ecologie des levures œnologiques

Les nombreux travaux de recherche consacrés à la description et à l'écologie des levures du vin montrent bien que *S. cerevisiae* est l'agent principal de la FA et qu'un certain nombre d'autres levures non-*Saccharomyces* y participent également. La Figure I-8 illustre les pourcentages relatifs entre des souches de levures œnologiques pendant les vinifications d'un vin blanc (A) et rouge (B) (Xufre et al., 2006). Les souches non-*Saccharomyces* sont majoritaires au début de la FA, puis deviennent minoritaires à la fin de FA où *S. cerevisiae* devient dominante. En effet, *S. cerevisiae* représente au début de la FA 40 % de levures du moût de vin rouge et 60 % des levures du moût de vin blanc. Cependant, à la fin des FA, cette levure représente 90 % des espèces levuriennes dans le vin rouge et 80 % dans le vin blanc. Parmi les non-*Saccharomyces*, les *K. marxianus* et *K. thermotolerans* sont les plus résistantes puisqu'elles sont encore présentes à la fin de la FA. On retrouve ensuite les *T. delbrueckii* dans le vin blanc.

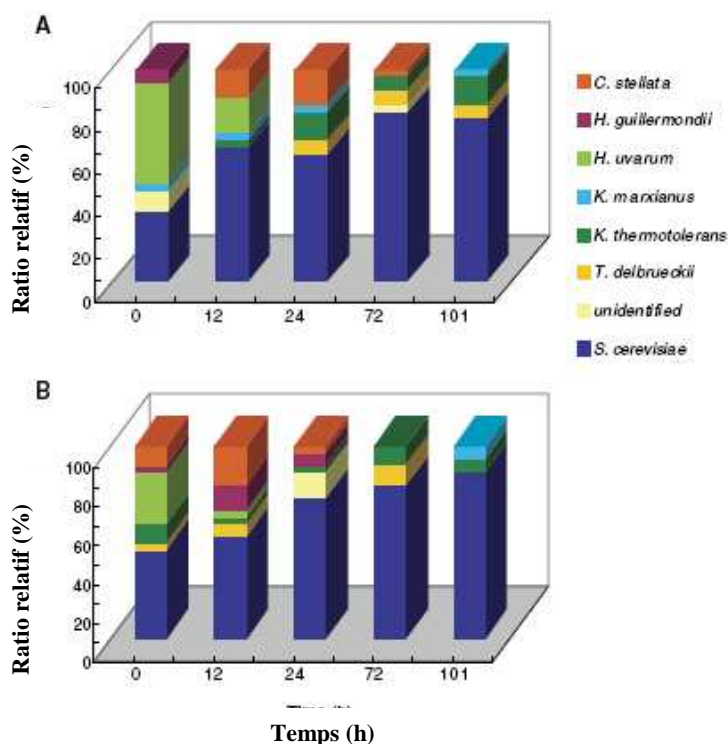


Figure I-8. La diversité des levures pendant des fermentations du moût de vin blanc (A) et de vin rouge (B) (Xufre A. et al., 2006).

En conséquence, les populations de levures très diverses au début de la FA deviennent plus homogènes à la fin de la FA avec la présence majeure de *S. cerevisiae* et très peu d'autres non-*Saccharomyces*. Outre l'éthanol, les conditions acides et osmotiques du jus de raisin, les conditions anaérobies et l'emploi du SO₂ limitent la croissance de la plupart des levures, des moisissures et des bactéries de la flore indigène du raisin autres que *S. cerevisiae*.

I-3-3-4 Comparaison des caractéristiques de T. delbrueckii et S. cerevisiae en œnologie

Les levures œnologiques sont des microorganismes hétérotrophes, utilisant spontanément la respiration et les fermentations pour tirer l'énergie des molécules organiques qu'elles ont prélevées dans le milieu. Pour leur développement ces levures ont besoin d'oxygène pour la production de biomasse et des stérols, des composés carbonés comme source de carbone et d'énergie, des composés azotés réduits sous forme d'ammonium ou organiques pour la synthèse de protéines et d'acides nucléiques et des éléments minéraux variés, vitamines et facteurs de croissance qui varient selon les levures (Mauricio et al., 1991). Les besoins en nutriments, en général, des levures œnologiques *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sont présentés dans le Tableau I-5.

Tableau I-5. Besoins en nutriments des levures œnologiques

<i>Nutriments</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>Références</i>
Sucre (g/L)	200 - 300	200 - 240	Charoenchai et al., 1988
Azote assimilable total (mg/L)	> 270	70-140	Mendes et al., 2004
Azote ammonium (mg/L)	> 50	> 50	Bely et et al., 2003
Minéraux (mg/L)	Oui	Oui	
Vitamines (mg/L)	Oui	Oui	
Thiamine (mg/L)	0,5	0,5	Ribéreau-Gayon, 2006
Pantothénate de calcium (mg/l)	0,5	0,5	Ribéreau-Gayon, 2006
Facteurs de croissance (mg/L)	Oui	Oui	
Ergostérol	15 - 25	15 - 25	Mauricio et al., 1998
Acide oléique	15 - 35	15 - 35	Mauricio et al., 1998
Oxygène (mg/L)	5 – 7	7 - 12	Hanl et al., 2005
pH optimal	3 - 4	3 - 4	Charoenchai et al., 1988
Température optimale (°C)	20 - 30	20 - 30	Bunte, 2009

Généralement parlant, *T. delbrueckii* peut fermenter un peu moins de sucre (200 – 240 g/L) que *S. cerevisiae* (200 – 300 g/L) et a besoin de plus d'oxygène que *Saccharomyces* pour se multiplier. Cependant, la capacité de consommation de l'oxygène de ces deux levures dépasse largement les concentrations que les opérations au cours de la vinification peuvent apporter. Pour l'azote, si le moût de raisin contient environ 300 mg N/L d'azote assimilable, dont 200 mg N/L d'azote aminé. *S. cerevisiae* le consomme totalement pendant les premiers jours de la FA tandis que *T. delbrueckii* en laisse une quantité résiduelle non-négligeable à la fin de la FA. Les autres besoins de ces deux levures sont similaires car elles peuvent fermenter du milieu ayant les mêmes concentrations de minéraux, vitamines, facteurs de croissances. Elles ont un pH optimal de 3 à 4 et la température optimale comprise entre 20°C et 30°C. Finalement, *Saccharomyces* et *Torulaspota* ont des besoins en nutriments et en conditions physiques du milieu relativement similaires.

Malgré sa faible population pendant la FA, *T. delbrueckii* contribue significativement à la cinétique de FA, la réduction de l'acidité volatile, l'amélioration de la production des arômes en particulier la révélation des arômes variétaux du jus de raisin, et aussi à l'accélération de la FML du vin... (Ciani et al., 1998 et 2006, Bely et al., 2008, Bunte et al., 2009, Renault et al., 2009 ; Pillet et al., 2010). *T. delbrueckii* est une levure fermentaire facultative (Hanl et al., 2005) apportée par les baies de raisin (Renault et al., 2009) qui se multiplie pendant les premiers jours de FA (Lema et al., 1996). *T. delbrueckii* est moins tolérante à la concentration élevée de sucre, au SO₂ et à l'éthanol que *S. cerevisiae*. Par ailleurs, cette dernière peut produire des facteurs inhibant la croissance de *T. delbrueckii* (Albergaria et al., 2010). Cependant, *T. delbrueckii* peut être encore présente en fin de la FA (Figure I-8), mais avec une population mineure (Xufre et al., 2006). Même si des souches sélectionnées de *Torulaspota* peuvent fermenter des milieux à 240 g/L de sucre et produire 11 à 12% v/v d'éthanol à la fin de FA (Renault et al., 2009), dans la plupart des cas, *Torulaspota* n'est pas capable de finir elle-même la FA, avec un risque de FA languissante (Bely et al., 2003). Par conséquent, il est nécessaire d'ajouter des *Saccharomyces* dans les FA de *Torulaspota* pour finir la FA, et pour réduire les défauts aromatiques fermentaires dans quelques cas particuliers. *Torulaspota* peut produire de grandes quantités d'acétate d'isoamyle qui sont à l'origine des notes amyliques (Languet et al., 2005).

Dans une étude de Ciani et al., (1998) sur les propriétés œnologiques des levures non-*Saccharomyces* associées à la vinification, *T. delbrueckii* s'avère être une bonne productrice d'éthanol (9,35 %v/v), meilleure que *C. stellata* (5,83 %v/v). Le plus important est qu'en général, *T. delbrueckii* produit, en moyenne moins de produits secondaires indésirables comme l'acide acétique (0,32 g/L), l'acétaldéhyde (22,6 mg/L), l'acétoïne (5,6 mg/L)... (Ciani et al., 1998). D'autre part, elle produit davantage de 2,3 butanediol (0,86 g/L) et d'acide succinique (0,53 g/L) que la souche *S. cerevisiae* (0,77 g/L et 0,42 g/L, respectivement). Par ailleurs, *Torulaspota* produit très peu de H₂S (œuf pourri) et de méthionol (chou fleur),

indésirables dans le vin. Le Tableau I-6 montre la production moyenne des composés volatils majeurs de 12 souches de *T. delbrueckii*.

Tableau I-6. Production moyenne des composés volatils majeurs par 12 souches de *T. delbrueckii* dans un milieu synthétique modèle : 240 g/L de sucre à 24 °C (Renault et al., 2009)

<i>Composé volatil</i>	<i>Concentration moyenne (mg/L)</i>	<i>Composé volatil</i>	<i>Concentration moyenne (mg/L)</i>
Acétaldéhyde	0,13	Alcools supérieurs totaux	103,18
Diacétyl	3,34	Isobutanol	17,52
Acétoïne	0,71	Alcool d'isoamyle	59,94
Esters totaux	3,29	β-Phenylethanol	24,54
Acétate d'isoamyle	0,02	Butane-1-ol	0,22
Lactate d'éthyle	3,12	2,3-Butanediol	0,93
Succinate de diméthyle	3,12	Alcool de benzyle	0,03
3-hydroxybutyrate d'éthyle	0,06	Acides gras totaux	2,22
Butyrate d'éthyle	Nd	Acide butyrique	0,17
Hexanoate d'éthyle	Nd	Acide iso butyrique	1,55
Octanoate d'éthyle	Nd	Acide hexanoïque	0,12
Acétate de phényléthyl	89,07 (µg/L)	Acide octanoïque	0,09
Lactone	Nd	Acide décanoïque	0,22
γ-butyrolactone	0,16	Acide isovalérique	65,68

La présence et la prédominance successives de *Torulasporea* et *Saccharomyces* pendant la FA offrent de nombreux avantages :

Optimisation de la diversité des produits et sous-produits de la FA (Herraiz et al., 1990, Ciani et al., 2006 et Bely et al., 2008...),

Diminution de certains défauts analytiques des vins, dont l'acidité volatile (Bely et al., 2008)

Révélation du potentiel aromatique des vins : les activités enzymatiques de ces levures non-*Saccharomyces* renforcent les arômes variétaux de type terpènes et les notes thiolées. Certaines études notent l'impact de *T. delbrueckii* sur les composés aromatiques variétaux, y compris des norisoprénoides, terpénols, benzenoides, phénols volatils, vanillines et lactones (Hernandez-Orte et al., 2008 et Zott et al., 2009).

Inhibition de la croissance des microorganismes indésirables grâce à la production de toxines killers par des souches *T. delbrueckii* (Bonilla-Sallnas et al., 1995),

Accélération de la FML dans le cas de l'utilisation de levure sèche active *T. delbrueckii* (Prelude Chr Hansen) (Bunte, 2009).

En résumé, ces critères donnent à *T. delbrueckii* un potentiel œnologique important pour améliorer la qualité sensorielle du vin, y compris sa typicité. Il est recommandé, cependant, de l'utiliser simultanément avec *S. cerevisiae* pour éviter l'échec de la FA et les défauts aromatiques.

I-3-4 Les facteurs influant la FA

Le moût de raisin, de composition variable selon les millésimes peut offrir aux levures des conditions favorables ou défavorables. Outre la composition chimique du moût, plusieurs facteurs peuvent influencer le développement des levures et le bon déroulement de la FA. Ces facteurs peuvent être divisés en 3 groupes : chimiques, physicochimiques et biologiques (cf. Tableau I-7).

Tableau I-7. Les facteurs influant sur la croissance et l'activité fermentaire des levures

	<i>Facteurs influents</i>	<i>Références</i>
Chimiques	Sucres Azotes Éléments minéraux Vitamines Acides gras et facteurs anaérobies Ethanol et SO ₂	Ribéreau-Gayon et al., 2006 Julien et al., 2000 Ribéreau-Gayon et al., 2006 Ribéreau-Gayon et al., 2006 Mauricio et al., 1998 Pina et al., 2004
Physico-chimiques	Oxygène Température pH Facteurs associés à la vinification (pratique de cave, sulfitage, macération, clarification...)	Holm et al., 2001 Charoenchai et al., 1998 Akin et al., 2008 Cocolin et al., 2003 et Aragon et al., 1998
Biologiques	Interactions entre des microorganismes	Cani et al., 2006 et 2010

I-3-4-1 Sucres

Les levures utilisent les sucres du moût de raisin comme source de carbone et d'énergie pour assurer leurs fonctions vitales. Le moût de raisin contient en général de 170 g/L à 220 g/L de sucre, voire 300 – 350 g/l dans les raisins destinés à la fabrication du vin doux ou liquoreux. Le fructose et le glucose représentent 99 % des sucres des moûts de raisins. Le

rapport de fructose / glucose est de 50/50. Plus la teneur du sucre dans le moût de raisin est élevée, plus la pression osmotique du moût est grande réduisant la capacité fermentaire des levures dans la FA. La pression osmotique est une condition sélective naturelle primordiale pour les levures œnologiques. Les *S. cerevisiae* sont plus tolérantes et mieux adaptées que les non-*Saccharomyces*. En effet, les levures répondent à la pression osmotique élevée du moût par l'augmentation de la production et l'accumulation de glycérol afin d'équilibrer la pression osmotique (Blomberg and Alder, 1989, 1992; Myers et al., 1997). Dans la levure *S. cerevisiae*, le mécanisme de cette régulation est due à l'expression de certains gènes (ALD2 et ALD3) codant pour la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (Erasmus et al., 2003; Pigeau and Inglis, 2005). Pour maintenir l'équilibre redox intracellulaire, les levures génèrent une quantité équivalente de NADH cytoplasmique. Ceci est réalisé par la baisse de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol et l'augmentation de l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate, donc la surproduction de glycérol et d'acétate par *S. cerevisiae*. Par contre, *T. delbrueckii* produit une quantité non-négligeable de glycérol mais très peu d'acide acétique dans les mêmes conditions, ce qui suggère que *T. delbrueckii* ne produit pas d'acide acétique dans des conditions osmotiques élevées (Renault et al., 2009). En général, *Saccharomyces* est capable de fermenter du moût ayant une teneur en sucre plus élevée que *Torulasporea*. L'augmentation de la concentration initiale du sucre de la FA de 200 g/L à 300 g/L ne change pas la vitesse spécifique maximale de croissance et la production de biomasse de *S. cerevisiae* (0,16 - 0,17 h⁻¹ et 2,20 – 1,90 g/L, respectivement), mais elle diminue d'une façon remarquable celles de *T. delbrueckii* (0,15 - 0,09 (h⁻¹) et 1,5 – 0,8 g/L, respectivement) (Charoenchai et al., 1998). Cela explique la domination de *Saccharomyces* sur *Torulasporea* dans la vinification de moûts ayant une teneur élevée en sucre.

I-3-4-2 Azote

Le moût de raisin est relativement riche en constituants azotés, de 0,1 à 1 g/L d'azote soluble.

Les composés azotés que l'on retrouve dans le jus de raisin sont : des cations ammonium (3 – 10 % de l'azote total), des acides aminés (25 – 30 %), des polypeptides (25 – 40 %) et des protéines (5 – 10 %). L'ammonium et les acides aminés constituent l'azote assimilable par les levures. Ils sont essentiels pour la croissance et l'activité fermentaire des levures. Gockowiak et al., (1992) ont montré que la teneur totale en azote aminé du moût de raisin est différente de l'un à l'autre. Elle est en moyenne d'environ 200 mg /l, tandis que celle de l'ammonium est de 40 mg/L. L'ammonium du moût est assimilé très vite dans la phase de croissance des levures pour la synthèse des acides aminés à partir des chaînons carbonés libérés par la voie glycolytique tandis que les acides aminés du moût sont utilisés par les levures d'une part pour synthétiser des protéines de structures cellulaires, d'autre part pour produire des alcools supérieurs. En général, les levures consomment totalement l'azote

assimilable entre le tiers et le milieu de la FA. Ceci contribue à la chute de pH du milieu fermentaire à sa valeur minimum avant que le pH ne remonte grâce à l'accumulation de l'éthanol dans le dernier tiers de la FA (Akin et al., 2008).

Les levures *S. cerevisiae* ne possèdent pas les enzymes capables d'hydrolyser des polypeptides et des protéines du moût de raisins. Cependant, les levures peuvent elles-mêmes synthétiser les acides aminés dans le cas d'un moût pauvre en acides aminés. On recommande l'ajout d'ammonium pour des moûts contenant moins de 130 mg N/L (Bely et al., 1990). Certains auteurs donnent la teneur optimale en azote assimilable en g d'azote par g de sucres fermentescibles, ce qui correspond à 0,62 à 0,91 g/G selon les souches de *Saccharomyces* œnologiques (Taillandier et al., 2006). On estime qu'un enrichissement est nécessaire en azote assimilable quand la teneur en NH_4^+ du moût est inférieure à 25 mg/L, et utile pour des valeurs comprises entre 25 mg/L et 50 mg/L. Le sulfate diammonique (autorisé par la CEE) est souvent utilisé en Europe à la teneur maximale de 1g/l et il est recommandé de l'ajouter dès le début de la FA, moment où les levures ont de forts besoins pour la synthèse des acides aminés et protéines.

D'autre part, il a été montré que les mélanges complexes de sels d'ammonium et d'acides aminés possèdent une efficacité maximale, à la fois sur la croissance de levures et sur la vitesse de la FA (Beltran et al., 2005). L'addition d'azote assimilable au moût a aussi une influence sur les concentrations des alcools supérieurs et des esters du vin final. Les caractères organoleptiques du vin sont donc affectés (Garde-Cerdán et al., 2008). Miler et al., (2007) ont trouvé que l'addition des acides aminés (170 mg/L) dans le moût de raisin Chardonnay (contenant 222,6 mg N/L d'acides aminés) améliore les concentrations des alcools supérieurs, mais n'augmente pas celles des esters. Pour se développer, *Torulasporea* semble avoir besoin de quantités d'azote inférieures à celles de *Saccharomyces* (Ciani et al., 2006 et Bely et al., 2008). Mendes-Ferreira et al., (2004) ont constaté que *S. cerevisiae* a besoin d'au moins 267 mgN/L d'azote assimilable pour fermenter 200 g/l du sucre en vin sec (moins de 2 g/L de sucre résiduel) tandis que Bely et al., (2008) montrent que le milieu fermenté par *Torulasporea* contient encore des quantités considérables en azote assimilable.

I-3-4-3 Éléments minéraux (les oligo-éléments)

Les éléments minéraux sont présents en très faibles quantités, voire à l'état de trace dans le moût de raisin mais ils sont importants pour les métabolismes cellulaires. Les éléments minéraux, aussi nommés oligo-éléments, contiennent des molécules minérales comme K, Na, P, Mg, Mn... et leurs sels, leurs oxydes comme KCl, NaCl, K_2O , Na_2O , P_2O_5 , MgO... et plusieurs autres traces minérales, Al, Ag, Br, Cr, Pb, Sn, Zn... En général, ces minéraux sont des constituants des enzymes métalliques intervenant dans les voies métaboliques. On peut considérer que le moût contient assez d'oligo-éléments par rapport aux besoins des levures. Les levures sèches contiennent de 5 % à 10 % de matières minérales dont la composition

moyenne, en pourcentage du poids de cendres, est la suivante : K₂O (de 23 - 48 %), Na₂O (0,06 - 2,2 %), CaO (1 - 4,5 %), MgO (3,7 - 8,3 %), P₂O₅ (45 - 59 %) et Fe₂O₃ (0,06 - 7,3 %). Dans le cas où cela s'avère nécessaire, des compléments peuvent être ajoutés afin de compenser les oligo-éléments déficients dans le moût avant la FA (Ribéreau-Gayon et al., 1975).

I-3-4-4 Vitamines

Les vitamines sont considérées comme un des activateurs importants de la FA puisqu'elles participent aux coenzymes des enzymes métaboliques des levures et agissent donc sur la multiplication et l'activité cellulaire. Le moût de raisin contient plusieurs facteurs de croissance différents à des niveaux normalement suffisants pour couvrir les besoins des levures (cf. Tableau I-8).

Tableau I-8. Teneurs extrêmes en facteurs de croissance des moûts et des vins (en µg/L sauf mésoinositol en mg/L) (Ribéreau-Gayon et al., 1975).

<i>Vitamines</i>	<i>Moûts de raisins</i>	<i>Vins blancs</i>	<i>Vins rouges</i>
Thiamine	160-450	2-58	103-245
Riboflavine	3-60	8-133	0,47-1,9
Acide pantothénique	0,5-1,4	0,55-1,2	0,13-0,68
Pyridoxine	0,16-0,5	0,12-0,67	0,13-0,68
Nicotinamide	0,68-2,6	0,44-1,3	0,79-1,7
Biotine	1,5-4,2	1-3,6	0,6-4,6
Mésoinositol	380-710	220-730	290-334
Cobalamine	0	0-0,16	0,04-0,10
Choline	19-39	19-27	20-43

L'addition de vitamines est quelquefois utile pour améliorer la cinétique fermentaire. L'apport de la biotine et surtout de la thiamine s'est révélé efficace dans de nombreuses expériences. La population viable de levures augmente de 30 % par l'addition de 0,5 mg/L de thiamine dans le moût entraînant une augmentation de la vitesse de consommation du sucre. L'ensemble des vitamines est indispensable pour la croissance et l'activité fermentaire des levures. Dans les moûts ayant une teneur d'azote assimilable très élevée, le taux de l'acide pantothénique (une vitamine concernée dans la production des acides aminés contenant du sulfure) peut être perturbé et en conséquence des odeurs indésirables de sulfure peuvent se former (O'Kennedy, 2008). L'ajout de mélanges de vitamines pures n'est pas permis dans tous les pays. En Europe seulement la thiamine est autorisée. Pourtant, les produits de levures

inactivées se sont avérés être une bonne source pour augmenter les vitamines dans les moûts de raisins. Ils sont aussi efficaces et même davantage que le mélange des vitamines pures pour prévenir des fermentations languissantes (O'Kennedy, 2008).

I-3-4-5 Acides gras et facteurs anaérobies

Les stérols et les acides gras non-saturés sont des composés jouant un rôle important dans la définition des caractéristiques de la membrane cytoplasmique des levures. Leur teneur affecte notamment la tolérance à l'éthanol des cellules et de ce fait influe sur la viabilité et la capacité fermentaire des levures (Mauricio et al., 1998 et Valero et al., 1998). Si l'ergostérol est le stérol prédominant, le zymosterol et 5-dehydroergostérol sont également présents dans la membrane cellulaire. En présence d'oxygène, la levure est capable de synthétiser ces stérols, ce qui n'est pas le cas en condition d'anaérobie stricte. La levure est également capable d'assimiler les stérols et acides gras présents dans le milieu. En condition œnologique où l'oxygène est présent en faible quantité et où le moût de raisins n'a pas toujours des teneurs importantes en stérols et acides gras, la production et l'assimilation par les levures de ces constituants ne sont pas toujours suffisantes et peuvent parfois conduire à une fermentation inachevée (Luparia et al., 2004). C'est pourquoi, en conditions de laboratoire, l'ajout d'ergostérol et d'acide oléique (nommés par le terme facteurs anaérobies) est souvent réalisé afin d'assurer les besoins pour la croissance des levures.

Dans les moûts de raisins, la teneur des acides gras de C12 :0 à C26 :0 est d'environ 300 mg/L. Cette teneur diminue progressivement lors du processus de vinification jusqu'à la mise en bouteille et atteint des valeurs de l'ordre de 4 - 5 % de la teneur initiale. Un groupe de chercheurs japonais (Yunoki et al., 2005) a trouvé dans 11 types de moûts de raisins cultivés au Japon que la teneur moyenne des acides gras variait entre 30,5 et 82 mmol/100 mL. Ils ont détecté 16 acides gras différents ayant des chaînes supérieures à 12 carbones. Les acides palmitique, linoléique et linoléique sont généralement présentés comme composés majeurs avec des proportions allant de 21,6 à 30,1 %, de 26,6 à 47,4 %, et de 9,2 à 20,5 % respectivement de la totalité des acides gras. L'acide oléique est aussi un des acides gras majeur, avec une teneur de 13,7 à 21,3 mg/L. On trouve également environ 5-10 mg/L de phytostérols dans le moût de raisin, dont 90 % de β -sitostérol, 5 % de stigmastérol et 5% de campestérol (Luparia et al., 2004). Ces auteurs montrent qu'en condition œnologique les levures *S. cerevisiae* absorbent totalement ces phytostérols dans la phase de croissance, mais ne les modifient pas. Ces phytostérols peuvent jouer efficacement un rôle de substitut à l'ergostérol dans la membrane pour favoriser sa croissance et son activité fermentaire initiale. Cependant, la FA lors de l'ajout de phytostérols reste toujours incomplète en raison de la perturbation de la membrane levurienne. Ceci provoque généralement une diminution forte de sa viabilité pendant la phase stationnaire. En vinification en blanc, l'activité de débouillage

diminue fortement les concentrations des acides gras et phytostérols dans le moût rendant parfois difficile l'achèvement de la fermentation.

Mauricio et al., (1998) ont étudié l'influence de l'oxygène sur la biosynthèse des acides gras, stérols et phospholipides dans les cellules pendant la FA par *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Ces auteurs ont trouvé que les besoins en oxygène de ces deux levures diffèrent de l'une à l'autre. En condition anaérobie, *S. cerevisiae* produit plus d'acides gras non-saturés et plus de biomasse que *T. delbrueckii*. D'ailleurs, l'activité fermentaire de la première est plus élevée que la dernière. L'addition d'ergostérol (25 mg/L) et d'acide oléique (31 mg/L) a permis de récupérer la totalité du taux de croissance cellulaire et de l'activité fermentaire de *S. cerevisiae* en anaérobiose mais pas pour *T. delbrueckii*. Cependant, une courte période d'aération de la culture de 48 h en anaérobiose a permis de récupérer totalement la croissance cellulaire et l'activité fermentaire pour les deux levures. L'effet de la courte période d'aération sur la synthèse des acides gras est similaire pour les 2 levures.

I-3-4-6 Oxygène

L'oxygène est indispensable pour la croissance des levures au début de la FA. Il joue un rôle sélectif pour la flore microbienne du vin. L'aération du moût influence la croissance des levures et leurs métabolismes fermentaires donc les concentrations en glycérol, en acétate et en composés aromatiques du vin.

En vinification en rouge, la macération apporte au moût des quantités suffisantes d'oxygène qui peuvent satisfaire les besoins des levures (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La concentration d'oxygène dissous à la saturation peut atteindre 7 à 8 mg/L à la température ambiante de 30 °C (Nissen et al., 2003). Cet oxygène est rapidement consommé par les levures dans la phase de croissance, principalement par les voies respiratoires mitochondriales et, seulement 15 % par les voies métaboliques de production des stérols et des acides gras non-saturés (Salmon et al., 1998), indispensables pour les membranes cellulaires mentionnées précédemment dans la partie 0 (Valero et al., 1998).

Les non-*Saccharomyces* dites levures oxydatives se multiplient au début de la FA quand le moût est riche en oxygène. Leur nombre diminue au fur et à mesure avec la diminution de l'oxygène dans le moût fermentaire et elles cèdent la place aux levures non-oxydatives comme la *S. cerevisiae* pour achever la FA. Dans les cas des fermentations œnologiques, l'oxygène est généralement apporté (par exemple par des remontages) pour augmenter la synthèse de biomasse et en conséquence la vitesse de la FA. Cet ajout serait plus efficace à la fin de la phase de croissance cellulaire et augmenterait la viabilité des cellules par de svoies dites NOC (Non respiratory Oxygen Consumption) (Rosenfeld et al. 2003). Pour ce type d'addition, pendant les vinifications, le besoin d'oxygène est modeste et est estimé à 5 à 10 mg/L. Cependant, les levures peuvent consommer des quantités élevées d'oxygène pendant la

FA sans provoquer des effets négatifs dans le cas où l'apport de l'oxygène ne dépasse pas 50 mg/L. Au delà, cet effet devient très négatif, aussi bien au niveau de la couleur que des arômes (Blateyron et al., 1998). Il est difficile pour les vinificateurs de contrôler précisément les concentrations d'oxygène transférées dans le moût et dans le vin, car plusieurs opérations technologiques favorisent forcément la dissolution d'oxygène (la mise en cuve, le pompage du moût, la macération, la filtration en membrane...).

Comme *S. cerevisiae*, *Torulaspota* est une levure fermentaire facultative. Il semble que *T. delbrueckii* ait des besoins en oxygène pour la biosynthèse supérieur à ceux de *S. cerevisiae* (Visser et al., 1990). Hanl et al., (2005) ont trouvé qu'en condition anaérobie, la μ_{\max} de *S. cerevisiae* est plus élevée ($0,40 \text{ h}^{-1}$) que celui de *T. delbrueckii* ($0,03 \text{ h}^{-1}$). Des photos de cellules des *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en condition anaérobie stricte sont présentées sur la Figure I-9. Il y a plus de mitochondries dans la cellule de *Torulaspota* que dans celle de *Saccharomyces*. Le rôle des mitochondries dans les réactions anaérobies de plusieurs non-*Saccharomyces* semble plus important que chez *Saccharomyces* (Visser et al., 1994). D'autres études montrent par contre que le besoin en oxygène de *T. delbrueckii* en conditions anaérobies (Mauricio et al., 1990, 1991; Ciani and Picciotti 1995; Charoenchai et al., 1998; Holm et al., 2001; Nissen and Arneborg 2003; Nissen et al., 2003, 2004) n'est pas remarquablement plus élevé que celui de *S. cerevisiae*.

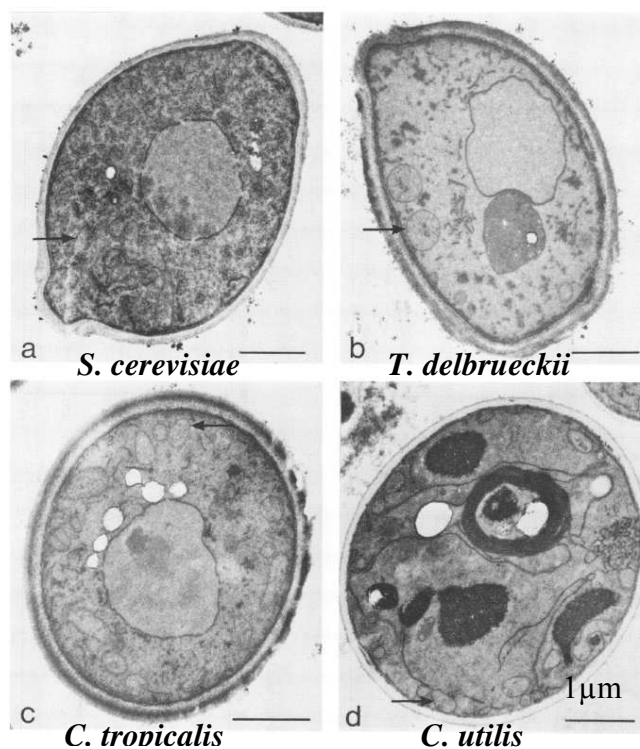


Figure I-9. Micrographies électroniques des levures développées en anaérobiose. (Les petites flèches présentent des pro-mitochondries) (Visser et al., 1990)

Il a été montré que la production de glycérol chez *S. cerevisiae* et chez *T. delbrueckii* est plus importante dans les FA en anaérobie stricte. Ces deux levures maintiennent dans ce cas leur balance redox par des mécanismes similaires de production de glycérol, voie alternative de génération de NAD^+ en l'absence d'oxygène, tandis qu'en présence d'oxygène, NADH, H^+ peut être réoxydé par la respiration (Hanl et al., 2005 ; Dijken and Scheffers, 1986). D'après Ciani et al., (2000), en anaérobie, la production de glycérol est le seul mécanisme à générer NAD^+ nécessaire pour la biosynthèse. Cette voie consomme une quantité importante d'ATP et présente un très faible rendement de biomasse en condition anaérobie.

La biosynthèse des arômes du vin est forcément dépendante des conditions fermentaires et de la croissance des levures. Les alcools supérieurs et les esters ont été plus produits en condition semi-aérobie que anaérobie, selon Mauricio et al., 1997. D'ailleurs, l'apport d'oxygène aux levures pendant la FA peut améliorer les caractères organoleptiques du vin produit. Au cours des FA strictement anaérobie, au moment où l'activité fermentaire est à son maximum, les niveaux de potentiel d'oxydoréduction peuvent atteindre des valeurs assez basses pour faire apparaître des odeurs de type "réduit". Un ajout d'oxygène réalisé à ce moment là peut alors faire basculer les équilibres d'oxydoréduction des composés soufrés à odeurs désagréables, et donc restaurer un nez plus favorable (Salmon, 2009).

En conclusion, l'oxygène du moût exerce un rôle indispensable d'une part pour la multiplication cellulaire des levures et d'autre part pour la synthèse des acides gras non saturés, facteurs essentiels de l'efficacité des membranes.

I-3-4-7 Température

La température joue un rôle important pour la qualité du vin puisqu'elle influence directement l'activité fermentaire des levures en affectant la vitesse de la FA, la production de l'éthanol, des arômes, des acides... .

La température favorable pour démarrer la FA est environ 25 °C. Si la température initiale du moût est inférieure à 20 °C, la FA est ralentie. Si la température de la FA dépasse 30 °C, il existe un risque d'une surproduction d'acide acétique par les levures et d'un arrêt prématuré de la FA. En général, en conditions œnologiques, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont la même température optimale pour la croissance variant entre 20 °C et 30 °C (Bunte, 2009). Comme le montre la Figure I-10, dans la zone de température optimale, il semble que la vitesse spécifique maximale de la croissance de *T. delbrueckii* est deux fois moins élevée que celle de *S. cerevisiae*. Quand la température de la FA a augmenté de 10 °C à 25 °C, le temps de division cellulaire de *S. cerevisiae* diminue de 17,3 h à 4,1 h, lorsque celui de *T. delbrueckii* baisse de 23,1 h à 5,0 h (Charoenchai et al., 1998). D'autre part, la température optimale de souches de *Torulaspora* diffère de l'une à l'autre (cf. Figure I-11) (Renault et al., 2009).

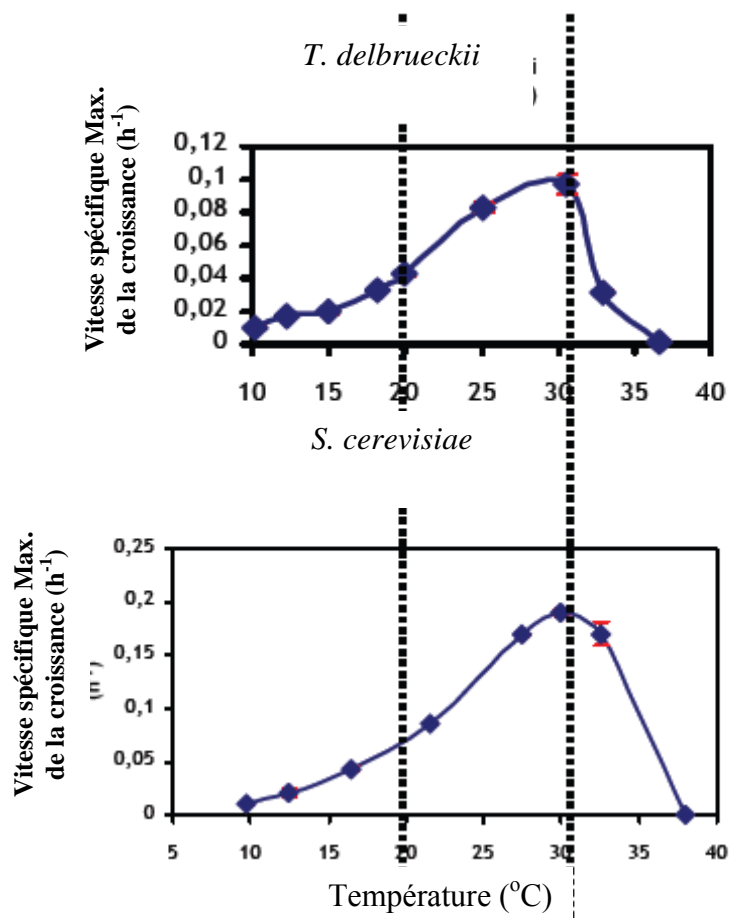


Figure I-10. Température optimale de croissance de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* (Bunte, 2009).

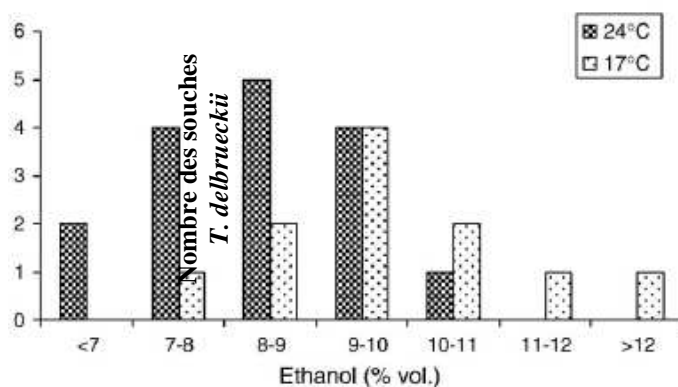


Figure I-11. Distribution du nombre de souches de *T. delbrueckii* par classes d'éthanol produit à 17 °C (11 souches testées) et à 24 °C (17 souches testées) dans un milieu synthétique modèle à 240 g/L de sucre

I-3-4-8 pH

Le pH des moûts et vins est compris généralement entre 3 et 4. En œnologie, le pH joue un rôle très important : élimination des micro-organismes indésirables, efficacité du sulfitage, stabilité du vin... Dans les moûts, le pH varie selon la région, le cépage, l'état de maturité et les conditions climatiques. La teneur en acides organiques comme l'acide tartrique, l'acide malique, l'acide citrique et les acides aminés est le facteur primordial affectant la valeur de pH du moût de raisin. L'acidité totale des moûts à maturité se place dans une fourchette de 3 à 12 g/L (H₂SO₄). Elle est généralement plus forte pour les moûts blancs que pour les rouges, et pour les moûts issus de régions froides que pour ceux issus de régions chaudes. Il est connu que les micro-organismes contaminant du vin comme les bactéries, les levures *Brettanomyces*, les moisissures ont souvent un pH optimal au-delà de 4 (supérieur au pH du jus de raisin). De plus, il y a une synergie entre le pH et l'efficacité du sulfitage. Plus le pH est bas, plus l'action du dioxyde de soufre ajouté est efficace. Dans les cas des levures non-*Saccharomyces* désirables, le pH optimal pour leurs croissances est de 3 à 4, similaire à celui des *Saccharomyces* (Charoenchai et al., 1998).

I-3-5 Les levures œnologiques sèches actives

Depuis plusieurs années, les levures sélectionnées sont des outils essentiels à la production du vin pour obtenir une qualité stable d'une année à l'autre. Même si dès 1890, Müller-Thurgau et Wortmann présentaient pour la première fois l'intérêt des levures sélectionnées et si différentes formules de levains liquides ont été disponibles sur le marché dès le début du 20^{ème} siècle, il a fallu attendre 1964 pour qu'une levure œnologique sèche active soit commercialisée (en Californie). Cette formulation des levures *S. cerevisiae* en LSA est maintenant très répandue (80-90% des vins français par exemple). Cependant, la différence entre vins fermentés par des cultures pures et ceux par une population complexe de levures indigènes a provoqué de nombreux débats, ceci dès l'apparition des LSA. Le levurage des moûts offre plusieurs avantages comme fiabiliser et homogénéiser des FA et contribuer à l'amélioration globale de la qualité des vins. Le levurage assure le développement immédiat des *S. cerevisiae* dans le moût de raisin ce qui permet de réduire ou de stopper la croissance des micro-organismes contaminants du vin (Languet et al., 2005 et Pillet et al., 2010). Cependant, il élimine aussi la population des levures non-*Saccharomyces*, auxquelles on reconnaît un rôle important pour l'équilibre du profil aromatique du vin (Holm et al., 2001 ; Nissen et Arneborg, 2003 ; Ciani et al., 2006 et Belly et al., 2008).

A l'heure actuelle, plusieurs centaines de souches différentes de levures œnologiques sont disponibles sous la forme de levures sèches actives. Les levures sèches actives doivent généralement répondre aux critères spécifiques mentionnés dans le Tableau I-9.

Tableau I-9. Critères de sélection des levures sèches actives

Critères principaux pour les LSA	Critères supplémentaires pour les LSA
<ul style="list-style-type: none"> - Achèvement de la FA - Tolérance à la concentration élevée de sucre dans le moût - Tolérance à l'éthanol et au SO₂ - Tolérance aux températures basses et élevées - Tolérance à la pression élevée (vins effervescents) - Production de faibles quantités d'acide acétique, d'acétaldéhyde, de H₂S, de mercaptans, de diacétyl, de SO₂ et d'alcools supérieurs. - Production d'une faible quantité de mousse - Bonne floculation après la FA afin d'assurer une clarification convenable pour le vin sec 	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'une variété de saveurs désirables - Métabolisme d'une large portion d'acide malique dans le moût - Production de glycérol - Activité faible de β-glucosidase - Killer ou neutre vis-à-vis des levures indigènes du moût de raisin - Excrétion faible d'urée - Formation d'esters - Production de protéases - Production de substances inhibitrices contre des micro-organismes contaminants

Jusqu'à récemment, il n'existait pas de levain non-*Saccharomyces* sous forme sèche active suffisamment stable pour favoriser la multiplication de ces levures en conditions œnologiques. Les vinificateurs ne pouvaient compter que sur le développement spontané des levures indigènes pour bénéficier de leurs effets positifs, avec les risques de difficultés de FA et de déviations sensorielles inhérents à ce processus aléatoire et non maîtrisé.

Aujourd'hui, quelques souches sèches actives de *T. delbrueckii* sont proposées aux viticulteurs. Elles doivent être utilisées avec une levure *Saccharomyces* pour rendre la FA efficace et rapide. En conséquence, des combinaisons de levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* pour le levurage sont mises en place pour améliorer la qualité sensorielle du vin et révéler des caractéristiques organoleptiques spécifiques. Sur le marché actuel, deux grands producteurs de levures œnologiques sèches actives, CRH Hansen et Lallemand ont commencé à commercialiser des kits de levures sèches actives combinant non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. Le premier producteur propose une culture mixte de levures *Kluyveromyces* (10%), *Torulaspota* (10%) et *Saccharomyces* (80%) (Viniflora[®] HARMONY.nsa). Le deuxième producteur propose un ensemencement séquentiel de levures *Torulaspota* et *Saccharomyces* (Level2 TD[®]). Cette FA séquentielle se divise en deux ensemencements : le premier ensemencement se fait à l'encuvage, avec des levures *Torulaspota* puis le deuxième ensemencement par les levures *Saccharomyces* a lieu après une diminution de la masse volumique du moût de 15 points.

I-4 Interactions entre levures

En environnement œnologique, plusieurs groupes de micro-organismes cohabitent. Des interactions s'établissent alors entre les populations différentes. Elles ont lieu non seulement entre différents genres ou espèces comme les levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*, mais également entre différentes souches d'une même espèce. La présence ou l'absence de contact physique (interaction directe ou indirecte) entre les populations est un des critères généraux pour classer ces interactions entre microorganismes (Strehaiano et al., 2008). Une autre façon de les classer est la conséquence de l'interaction : inhibitrice ou activatrice (Renouf, 2006).

I-4-1 Types d'interactions

Neutralisme

Les composantes sont indifférentes l'une envers l'autre. Aucun changement dans la croissance des populations n'a lieu et la présence d'une population n'affecte pas l'autre. Ceci définit en fait l'absence d'interaction.

Interactions directes

Le contact physique entre les composantes du système sont à l'origine des ces interactions directes, dont **Prédation**, **Parasitisme** et **Symbiose** font parties. Une composante utilise l'autre comme aliment et la tue. C'est le cas de la **Prédation**. Pour le Parasitisme, une composante se sert de la seconde pour son développement mais ne la tue pas nécessairement. En fin, pour la **Symbiose**, les populations tirent un bénéfice réciproque de l'interaction. De plus, le type de **contact cellule-à-cellule** fait aussi partie des interactions directes. Dans, ce cas, une composante domine l'autre par la compétition de l'espace dans le milieu grâce à sa taille plus grande ou sa densité cellulaire plus élevée que l'autre.

Interactions indirectes

L'interaction indirecte entre les levures est réalisée par l'intermédiaire d'un ou plusieurs composés. Quand le composé est un substrat présent dans le milieu, il provoque une **Compétition**. Lorsque le composé est produit par l'une ou l'autre des composantes, on parle d'interactions de type **Amensalisme**, **Commensalisme** et **Mutualisme**.

La Compétition a lieu quand les populations ont besoin d'un même substrat. Le niveau initial des composantes, mais surtout leur taux de croissance respectif vont influencer le résultat de la compétition.

L'**Amensalisme** a lieu quand le composé libéré par l'une des composantes a un effet inhibiteur sur les autres composantes, alors que le **Commensalisme** a lieu quand le composé produit par l'une des composantes a un effet positif sur les autres composantes. Enfin, pour le

Mutualisme, chaque composante produit un composé qui est bénéfique à la croissance de l'autre composante.

I-4-2 Interactions entre des levures œnologiques

En vinification, les principales interactions décrites sont non seulement des interactions directes de type parasitisme, mais aussi des interactions indirectes de type amensalisme (Pommier et al., 2005) ou de type compétitif (Comitini et al., 2004). Néanmoins, il est probable, compte tenu de l'importante diversité microbienne, que d'autres types d'interactions soient également impliqués et encore inconnus car la connaissance des interactions est en effet limitée par les méthodes d'analyses utilisées (Renouf, 2006 ; Strehaiano et al., 2008).

I-4-2-1 Interactions entre les *Saccharomyces* en vinification

En vinification, il existe des interactions entre les levures *S. cerevisiae* et *S. bayanus* ou entre les souches *S. cerevisiae* elles-mêmes. Il existe aussi des levains de levures sèches actives contenant un mélange de *S. cerevisiae* ou/et *S. bayanus*, *S. uvarum* et leurs hybrides. En 2005, Cheraiti et al. ont étudié les interactions entre une souche de *S. cerevisiae* et un hybride de *S. cerevisiae* et *S. uvarum*. Le ratio des concentrations initiales des deux levures dans la culture mixte était de 50/50. Mais, au cours de la FA, le pourcentage de *S. cerevisiae* augmente et cette levure devient majoritaire (90 %) à la fin de la FA (80 h). De plus, les résultats ont montré que la souche hybride a produit des quantités importantes d'acétaldéhyde que *S. cerevisiae* a utilisé durant la culture mixte. Donc, cette relation est de type commensalisme puisque *S. cerevisiae* est favorisée par l'un des produits de la levure hybride.

Pommier et al., (2005) ont modélisé les dynamiques de croissance de cultures mixtes (une souche killer et une souche sensible) de *S. cerevisiae*. Cinq cultures mixtes ont été réalisées avec cinq ratios différents de cellules killers / sensibles (K/S) (5:100; 10:100; 20:100; 30:100; 60:100). Les résultats présentés sur la Figure I-12 montrent que dans la culture mixte, plus on augmente la quantité de souche killer inoculée, plus le taux de mortalité des souches sensibles au milieu de la FA est élevé. Il s'agissait dans ce cas d'amensalisme.

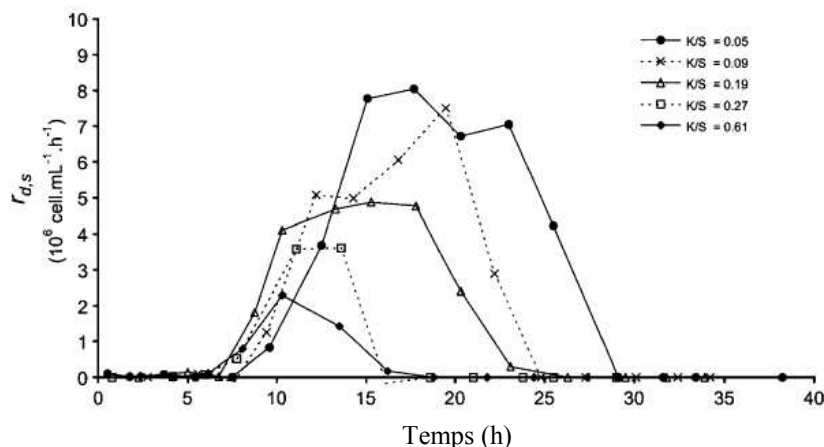


Figure I-12. Vitesse de la mortalité de population sensible dans les cultures mixtes ayant des ratios initiaux différents de levures killer/sensible (K/S)

I-4-2-2 Interactions entre *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*

L'utilisation de co-cultures de levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* pour les co-fermentations peut être une stratégie pour maîtriser la complexité et la typicité d'un vin. Dans le Tableau I-10 on récapitule les différentes études associant *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*, en précisant les objectifs visés et le procédé envisagé. Le Tableau I-11 recense les mécanismes d'interaction observés (synthèse de Ciani et al., 2010).

Plusieurs procédés de co-fermentations ont été proposés pour la vinification, en utilisant des levures œnologiques *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* (cf. Tableau I-10, Ciani et al., 2010). Par exemple, les cultures séquentielles de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* peuvent réduire la concentration de l'acide acétique et augmenter la complexité du vin tandis que la culture mixte de *S. cerevisiae* avec *C. stellata* ou *C. cantarellii* peut améliorer la quantité de glycérol et le profil aromatique du vin. Les cultures mixtes et séquentielles de *H. uvarum* ou *K. apiculata* améliorent également la complexité aromatique du vin. Ensuite, pour la réduction de l'acide acétique ou l'amélioration de l'acidité titrable, les cultures séquentielles de *K. thermotolerans* peuvent être utiles. De plus, les non-*Saccharomyces* comme *Schizosaccharomyces pombe* en co-cultures avec *S. cerevisiae* peuvent dégrader l'acide malique du moût. Les *T. delbrueckii*, *P. kluyveri* et *D. vanriji* peuvent être co-inoculées avec *S. cerevisiae* pour révéler les arômes thiolés variétaux du raisin et donner de la typicité. Enfin, la culture mixte de *S. cerevisiae* et *H. osmophila* apporte une augmentation de l'ester 2-phenylethyl acétate du vin. Cependant, les interactions entre des starters de cultures différentes et les modalités d'inoculation nécessitent d'être étudiés plus rigoureusement. Dans la plupart des cas, les *Saccharomyces* dominent les non-*Saccharomyces* par la compétition

Tableau I-10. Les procédés des co-fermentations proposés en vinification, en utilisant *S. cerevisiae* et des non-*Saccharomyces* (Ciani et al., 2010)

<i>Espèces utilisées</i>	<i>Objectif</i>	<i>Procédé</i>	<i>Références</i>
<i>S. cerevisiae</i> / <i>T. delbrueckii</i>	Réduction de la production d'acide acétique et augmentation de la complexité aromatique	Cultures séquentielles	Herraiz et al., 1990 ; Ciani et al., 2006 ; Bely et al., 2008 ; Pillet et al., 2010
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S. pombe</i> et <i>Schizosaccharomyces</i> spp	Dégradation de l'acide malique	Cellules immobilisées (batch procédé et procédé continu)	Taillandier et al., 1995 ; Yokotsuka et al., 1993 ; Ciani, 1995
<i>S. cerevisiae</i> / <i>C. stellata</i>	Amélioration de la concentration de glycérol	Cellules immobilisées (Culture séquentielle)	Ciani et Ferraro, 1996 ; Ciani et Ferraro, 1998
<i>S. cerevisiae</i> /C. <i>cantarellii</i>	Amélioration de la concentration de glycérol	Cultures mixtes ou séquentielles	Toro et Vazquez, 2002
<i>S. cerevisiae</i> / <i>C. stellata</i>	Amélioration du profil aromatique du vin	Cultures mixtes ou séquentielles	Soden et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> / <i>H. uvarum</i> ou (<i>K. apiculata</i>)	Simulation de la FA naturelle (amélioration de la complexité aromatique)	Cultures mixtes ou séquentielles	Zironi et al., 1993 ; Moreira 2005 ; Moreira et al., 2008 ; Mendoza 2007
<i>S. cerevisiae</i> / <i>K. thermotolerans</i>	Réduction de l'acide acétique et amélioration de l'acidité titrable	Cultures séquentielles	Mora et al., 1990 ; Kapsopoulou et al., 2007
<i>S. cerevisiae</i> / <i>I. orientalis</i>	Dégradation de l'acide malique	FA mixte	Kim et al., 2008
<i>S. cerevisiae</i> / <i>P. fermentans</i>	Augmentation de la complexité aromatique	Cultures séquentielles	Clemente-Jimenez et al., 2005
<i>S. cerevisiae</i> / <i>P. kluyveri</i>	Augmentation de thiol variétal	FA mixte	Anfang et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i> / <i>C. pulcherrima</i>	Amélioration du profil aromatique	FA mixte	Zohre et Erten, 2002 ; Jolly et al., 2003
<i>S. cerevisiae</i> / <i>D. vanriji</i>	Amélioration de la concentration de géraniol	FA mixte	Garcia et al., 2002
<i>S.cerevisiae</i> / <i>Schizosaccharomyces</i> et <i>Pichia</i>	Influence sur les propriétés sensorielles et physicochimiques du vin	Elevage sur lies pendant la maturation du vin	Palomero et al., 2009

Tableau I-11. Interactions principales présentées dans les FA mixtes et séquentielles des vins

<i>Espèces utilisées</i>	<i>Composé ou comportement</i>	<i>Interactions</i>	<i>Références</i>
S. cerevisiae / T. delbrueckii	Contact cellule-à-cellule Amensalisme : production de peptides inhibiteurs Compétition pour O ₂ Compétition pour l'azote	Augmente le taux de mortalité précoce des non- <i>Saccharomyces</i> Inhibition des <i>T. delbrueckii</i> Réduction des <i>T. delbrueckii</i> Diminution des <i>S. cerevisiae</i>	Nissen et Arneborg 2003 ; Nissen et al., 2003 Albergaria et al., 2010 ; Farkas et al., 2005 Holm et al., 2001 Bely et al., 2008
S. cerevisiae / K. thermotolerans	Contact cellule-à-cellule	Mort précoce des non- <i>Saccharomyces</i>	Nissen et al., 2003
S. cerevisiae / K. apiculata et C. pulcherrima	Alcools supérieurs et esters, diversité et typicité des arômes	Augmentation	Zohre et Erten, 2002
S. cerevisiae / Pichia fermentans	Composés aromatiques	Amélioration	Clemente-Jimenez et al., 2005
S. cerevisiae / H. guilliermondii	n-Propanol Acétoine	Augmentation Réduction	Zironi et al., 1993
S. cerevisiae / H. uvarum	Croissance et viabilité	Persistance des non- <i>Saccharomyces</i>	Ciani et al., 2006 ; Mendoza et al., 2007
S. cerevisiae / C. stellata	Acétaldéhyde, glucose, acétoine, et fructose	Consommation complémentaire	Ciani et Ferraro, 1998
S. cerevisiae / H. uvarum et H. guilliermondii	Acétate d'éthyle Esters Amensalisme	Réduction/Augmentation. Inhibition de <i>H. guilliermondii</i>	Moreira et al., 2008 Pérez et al., 2006
S. cerevisiae / P. anomala	Acétate d'isoamyle (estérase hydrolyse d'acétate d'éthyle)	Augmentation de production par <i>S. cerevisiae</i>	Kurita, 2008
S. cerevisiae / P. kluyveri	Acétate de 3-Mercaptohexyle	Augmentation des thiols	Anfang et al., 2009
S. cerevisiae / H. osmophila	2-phenylethyl acetate	Augmentation	Viana et al., 2009
Mélanges de levures naturelles	Composés volatils	Augmentation de la complexité aromatique	Garde et al., 2006 ; Varela et al., 2009

pour l'espace ou l'oxygène ou par la production de substances killer (cultures mixtes avec *T. delbrueckii* et *K. thermotolerans* (cf Tableau I-11, Ciani et al., 2010). L'interaction par amensalisme explique souvent la domination de *S. cerevisiae* sur les autres non-*Saccharomyces* comme *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* ou *Brettanomyces*... En fait, la connaissance scientifique des interactions métaboliques entre levures œnologiques *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* reste très limitée. De plus, leurs impacts sur la qualité du vin ne sont pas bien quantifiés ni contrôlés. Dans ce contexte, pour expliquer les mécanismes métaboliques des interactions entre ces levures, des outils et des techniques sont à développer, en particulier la connaissance de la régulation métabolique et génétique des levures non-*Saccharomyces* (Ciani et al., 2010).

I-4-2-3 Interactions entre des *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* dans la FA du vin

T. delbrueckii est une des plus importantes espèces non-*Saccharomyces* œnologiques présentes dans la microflore de levures du vin. Elle apparaît souvent en début de FA et disparaît par la suite de la FA (Lema et al., 1996 ; Xufre et al., 2006). Par ailleurs, un phénomène de synergie semble se dérouler entre ces deux levures d'un point de vue aromatique.

I-4-2-3-1 Mécanismes des interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*

Plusieurs types d'interactions entre *Saccharomyces* et *Torulaspora* ont été décrits : compétition pour les nutriments (Holm et al., 2001 ; Ciani et al., 2006 ; Bely et al., 2008) et l'espace (Nissen et al., 2003 ; Nissen et Arnboge 2003) ou amensalisme (Farkas et al., 2005 ; Albergaria et al., 2010).

Holm et al. (2001) ont trouvé que la mortalité précoce des *T. delbrueckii* dans les cultures mixtes avec *S. cerevisiae* en conditions anaérobies n'est pas due à la libération de produits métaboliques toxiques par *Saccharomyces*, mais plutôt à l'absence d'oxygène. En condition anaérobie, la population de *T. delbrueckii* chute fortement dès le 2^{ème} jour de FA tandis qu'en condition aérobie, sa population reste 2 jours de plus à son niveau maximal. Mais Nissen et al. (2003) ont constaté que la mortalité précoce de *T. delbrueckii* a lieu aussi dans les cultures mixtes en conditions aérobies par contact direct. Par ailleurs, la diminution de la croissance de *Saccharomyces* dans des cultures mixtes avec *Torulaspora* a aussi été mise en évidence pendant la FA du vin. Comme aucun produit toxique ou inhibiteur n'a été trouvé dans ces FA mixtes Ciani et al., (2006) et Bely et al., (2008) ont suggéré que la compétition pour l'azote du moût avec la levure non-*Saccharomyces* pouvait expliquer en partie le moindre développement de *Saccharomyces*... Pour tenter d'analyser le mécanisme exact, des co-

fermentations ont donc été réalisées dans des tubes de dialyse avec *S. cerevisiae* à l'intérieur du tube et *T. delbrueckii* à l'extérieur du tube (Nissen et al., 2003).

Les résultats présentés dans les Figure I-13, Figure I-14 et Figure I-15 montrent qu'à la fin de ces fermentations en contact indirect dans les tubes de dialyse, le taux de *S. cerevisiae* dans le milieu est équivalent à celui trouvé dans les cultures mixtes en contact direct avec les non-*Saccharomyces*. De plus, les concentrations d'éthanol dans les tubes de dialyse sont similaires à celles obtenues lors des fermentations réalisées par des cultures mixtes en contact direct. Ceci indique que le tube de dialyse à membrane utilisé est totalement perméable aux nutriments et métabolites des levures. Pendant les fermentations dans les tubes de dialyse, *T. delbrueckii* montre une même évolution des concentrations cellulaires que celle obtenue dans ses cultures pures, et ses concentrations sont plus élevées que celles obtenues dans les cultures mixtes en contact direct avec *S. cerevisiae*. Il a aussi été montré que les non-*Saccharomyces* ont été aptes à se développer dans le surnageant du milieu fermenté par les *Saccharomyces*.

En conséquence, on peut exclure la présence d'un composant inhibiteur soluble. Ces résultats suggèrent que les levures procèdent par un mécanisme de contact cellule-à-cellule qui régule leur croissance dans les cultures mixtes. D'autre part, l'inhibition par le contact cellule-à-cellules des *Torulaspota* par des *Saccharomyces* a été aussi prouvée par Nissen et Arnborge, (2003), en utilisant des tubes dialyses pour éliminer les contacts directs entre ces levures. Or, Zott, (2008) a montré que la perméabilité de la membrane utilisée pour étudier les interactions indirectes entre des levures non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces* diminue au cours de la FA et rend les résultats des études non fiables. En conséquence, pour étudier les interactions indirectes entre des micro-organismes, il faut utiliser des techniques et procédés plus efficaces comme le bioréacteur à membrane qui a été déjà utilisé pour mettre en évidence les relations indirectes entre des bactéries (Tataridis, 2001), des levures (Pommier et al., 2005) et entre ces deux types de micro-organismes (Nehmé, 2008).

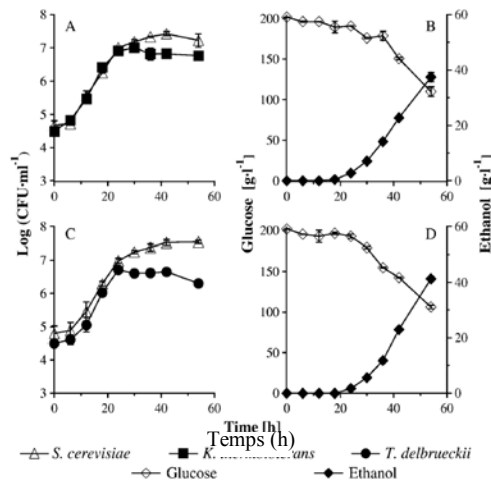


Figure I-13. Concentrations cellulaires, de glucose et d'éthanol pendant les FA mixtes en contact direct de *K. thermotolerans* (A, B) et *T. delbrueckii* (C, D) avec *S. cerevisiae* (Nissen et al., 2003)

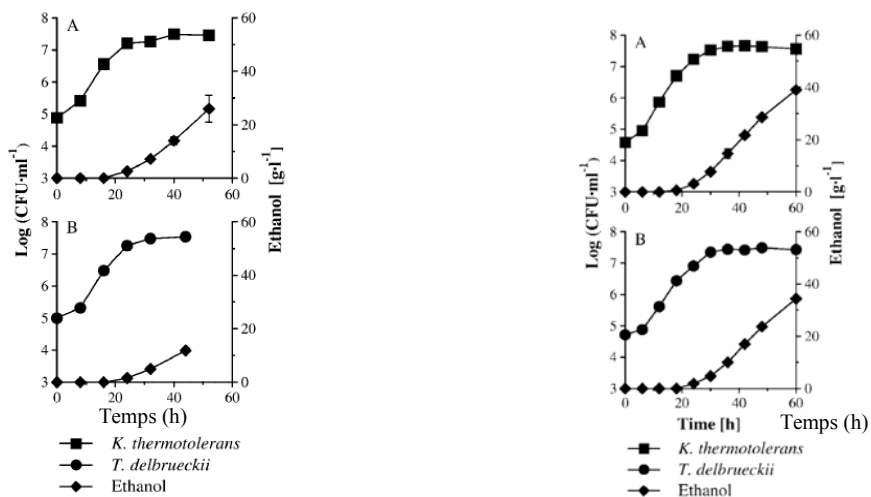


Figure I-14. Concentrations cellulaires et d'éthanol pendant les FA pures de *K. thermotolerans* (A) et *T. delbrueckii* (B)

Figure I-15. Concentrations cellulaires et d'éthanol pendant les FA mixtes de *S. cerevisiae* en contact indirect avec *K. thermotolerans* (A) et *T. delbrueckii* (B) dans des tubes dialyse

Enfin, l'inhibition de la population de *Torulaspora* par *Saccharomyces* dans leurs cultures mixtes se fait dans quelques cas par amensalisme ; *Saccharomyces* produit des facteurs inhibiteurs sur la croissance de *Torulaspora* (Farkas et al., 2005). Récemment, en 2010, Albergaria et al., ont trouvé quelques peptides (de 2 à 10 kDa) produits par *S. cerevisiae* qui ont inhibé la croissance des souches œnologiques de *T. delbrueckii* dans leurs cultures mixtes.

I-4-2-3-2 Types de fermentations (Co-fermentation et fermentation séquentielle)

Les co-fermentations sont des fermentations réalisées en inoculant en même temps deux ou plusieurs micro-organismes tandis que les fermentations séquentielles sont des fermentations réalisées en inoculant successivement dans le temps 2 ou plusieurs microorganismes. Dans les co-fermentations les interactions peuvent se produire dès l'inoculation et conduire à l'inhibition d'un micro-organisme par un autre. C'est le cas par exemple de *S. cerevisiae* sur la plupart des levures non-*Saccharomyces*, des bactéries lactiques et acétiques au cours des fermentations naturelles. Dans les fermentations séquentielles, on va chercher à favoriser le développement des micro-organismes avant que les espèces inhibitrices ne soient inoculées (Clemente-Jimenez et al., 2005 ; Ciani et al., 2006, Bely et al., 2008 ; Pillet et al., 2010...).

I-4-2-3-3 Impacts des co-fermentations et fermentations séquentielles de T. delbrueckii et S. cerevisiae sur la qualité aromatique du vin

En cultures pures, *Saccharomyces* et *Torulaspora* induisent en vinification des profils aromatiques significativement différents. En co-fermentations on peut envisager un accroissement des arômes désirables et une réduction des défauts dans les vins (Herraiz et al., 1990 ; Ciani et al., 2006 ; Bely et al., 2008 ; Pillet et al., 2010).

Ciani et al., (2006) ont étudié le comportement fermentaire et les interactions métaboliques lors de fermentations par des multi-starters de levures œnologiques. Les essais de co-fermentations ont été inoculés simultanément avec 10^6 cellules/mL de *T. delbrueckii* et 10^6 cellules/ mL de *S. cerevisiae*. Les essais de fermentations séquentielles ont été inoculés avec 10^6 cellules/ mL de *T. delbrueckii* puis l'addition de 10^6 cellules/ mL de *S. cerevisiae* après 4 jours (FA à 20 °C) ou 7 jours (FA à 15 °C). Les principaux résultats sont relevés sur la Figure I-16 et le Tableau I-12.

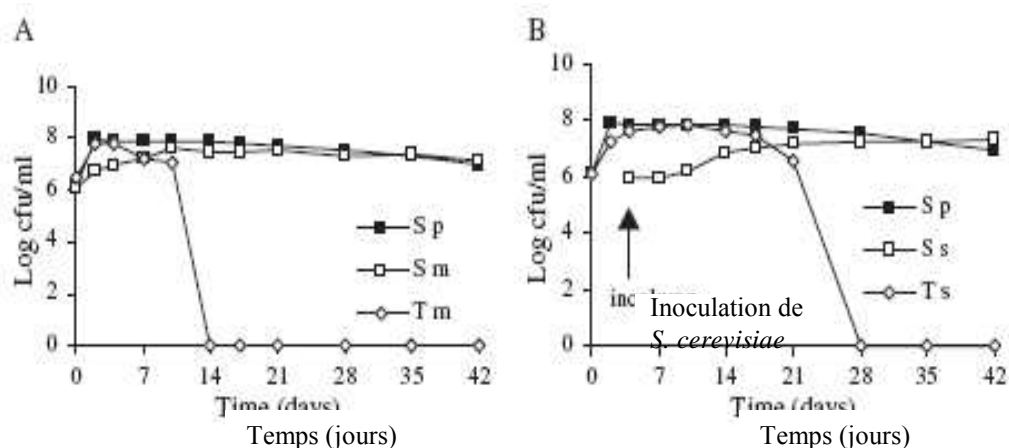


Figure I-16. Évolution de biomasse dans les co-cultures de *S. cerevisiae*/*T. delbrueckii* (à 20 °C. ■, culture pure *S. cerevisiae* (S p). (A) □, culture mixte *S. cerevisiae* (S m). □, culture mixte *T. delbrueckii* (T m). (B) □, culture séquentielle *S. cerevisiae* (S s). □, culture séquentielle *T. delbrueckii* (T s))

Tableau I-12. Produits secondaires de plusieurs fermentations à 20 °C (Ciani et al., 2006)

Essais de culture	Acétaldéhyde (mg/L)	Acétate d'éthyle (mg/L)	Acétoïne (mg/L)
<i>S. cerevisiae</i> pure	99,7 ± 15,3	59,6 ± 5,3	11,9 ± 3,7
<i>T. delbrueckii</i> pure	122,3 ± 2,1	61,7 ± 13,9	7,3 ± 0,8
Co-culture <i>S. cerevisiae</i> / <i>T. delbrueckii</i>	66,9 ± 8,6	59,7 ± 5,6	5,4 ± 0,8
Séquentielle <i>S. cerevisiae</i> / <i>T. delbrueckii</i>	32,5 ± 7,2	60,5 ± 5,8	2,7 ± 1,0

Dans la FA mixte avec *S. cerevisiae*, la population de *T. delbrueckii* a été fortement diminuée dès le 2^{ème} jour et a disparu totalement dès la 2^{ème} semaine de FA. En revanche, cette population n'a disparu qu'après la 4^{ème} semaine de FA séquentielle avec *S. cerevisiae* (cf. Figure I-16). Le Tableau I-12 montre que les co-cultures ont donné la même concentration d'éthyle acétate que la culture pure de *S. cerevisiae* (environ 60 mg/L), mais produit moins d'acétaldéhyde (32,5 - 66,9 mg/L) et d'acétoïne (2,7 - 5,4 mg/L) que la souche *S. cerevisiae* toute seule (99,7 mg/L et 11,9 mg/L, respectivement). Ces derniers ne sont pas favorables organoleptiquement au vin car ils donnent des saveurs de solvants et influence la stabilité du vin. Mais, la durée de la FA très longue et le sucre résiduel très important dans la culture séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* (7 jours de décalage) s'avèrent être des

désavantages par rapport à la co-culture de deux souches. Par ailleurs, la concentration d'acide acétique produite par la co-culture (0,40 g/L) et culture séquentielle (0,32 g/L) de ces deux levures est plus faible que celle de la culture pure de *S. cerevisiae* (0,71 g/L). La diminution de l'acidité volatile dans les cultures séquentielles de *Torulasporea* et *Saccharomyces* a été aussi rapportée par Herraiz et al., (1990) et Bely et al., (2008). Ceci montre que les non-*Saccharomyces* ont un potentiel pour diminuer la concentration de l'acide acétique dans les vins des moûts ayant une teneur en sucre élevée. Or, ces auteurs ont aussi trouvé que les fermentations séquentielles sont incomplètes entre ces deux levures. En conclusion, ces auteurs ont proposé que la FA mixte entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* était faisable dans le but d'augmenter la diversité sensorielle et de modifier les caractéristiques du vin.

On a observé aussi des différences significatives entre les vins issus de la culture mixte ou l'inoculation séquentielle de la *T. delbrueckii* et de la levure *S. cerevisiae* et le vin témoin issu de l'inoculation par souche *S. cerevisiae* pure (Herraiz et al., 1990, Languet et al., 2005, Ciani et al., 2006 ; Bely et al., 2008).

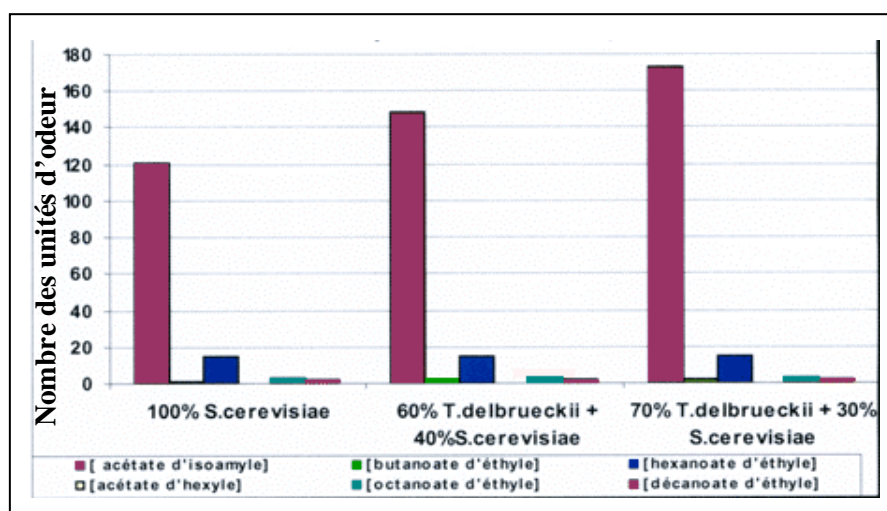


Figure I-17. Production d'esters avec des co-inoculations mixtes *Saccharomyces* / non-*Saccharomyces* (Languet et al., 2005).

Les mesures quantitatives des effets d'interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été menées dans une étude présentée par Languet et al., en 2005. Quantitativement, la production d'acétate d'isoamyle dans les vins avec des co-inoculations mixtes *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* a été augmentée significativement de 150 à 174 unités d'odeur (taux de la concentration d'ester / son seuil aromatique) dans les mélanges ou cultures mixtes de 60 % et 70 % *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae*, respectivement par rapport au vin issu de *S. cerevisiae* toute seule (120 unités d'odeur) (cf. Figure I-17).

Cette surproduction d'acétate d'isoamyle a provoqué les déséquilibres aromatiques dans ces vins de FA mixtes. Les notes amyliques (acétate d'isoamyle) deviennent prépondérantes dans le vin obtenu, et le profil général ressort alors moins complexe, moins typique et plus déséquilibré. A l'opposé, Bunte, (2009) a montré que le vin fermenté par un mélange commercial de CRH. Hansen (HARMONY.nsc) des levures sèches actives (*S. cerevisiae* (MERIT) 80 % et *T. delbrueckii* 10 % et *K. thermotolerans* 10 %) avait eu un profil aromatique plus désirable que ceux des vins témoins fermentés par les *S. cerevisiae* conventionnelles. Le vin de FA mixte a été plus fruité, présentant des arômes de mangue, de pomme et de pêche, et a présenté moins d'acidité, d'amertume que les vins témoins (cf. Figure I-18).

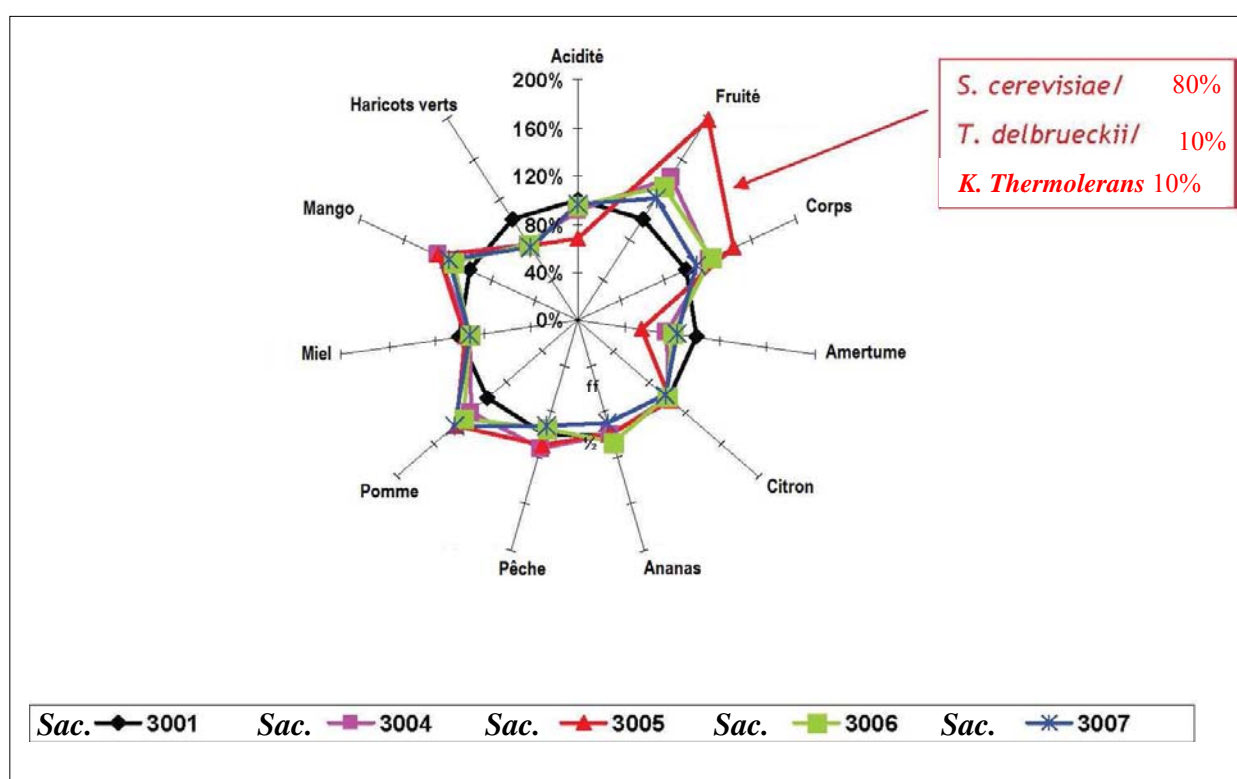


Figure I-18. Cycle aromatique des FA pures de *S. cerevisiae* et mixtes de *S. cerevisiae* 80 % et *T. delbrueckii* 10 % et *K. thermotolerans* 10 % (Bunte 2009).

Récemment, en inoculation séquentielle, Pillet et al., (2010) ont prouvé que l'inoculation de *Torulaspora* au début de la FA, avant l'addition de *Saccharomyces* pour finir la FA, favorise le développement de la complexité sensorielle du vin,. Le vin d'essai obtenu par l'inoculation séquentielle (*Torulaspora* et *Saccharomyces*) présentait une finesse et une élégance supérieure à celles du vin témoin soumis à l'inoculation conventionnelle (*Saccharomyces* seulement) (cf

Figure I-19).

Dans le vin de FA séquentielle, la concentration de la plupart des esters produits est plus grande que celle obtenue avec *S. cerevisiae*. De plus, certains traits comme « l'intensité aromatique » les perceptions olfactives "fruits frais", " fruits cuits " ou " floral " étaient intensifiés. On a obtenu une typicité particulière bien marquée et de plus, le défaut végétal diminuait significativement dans le vin de FA séquentielle par rapport au vin témoin.

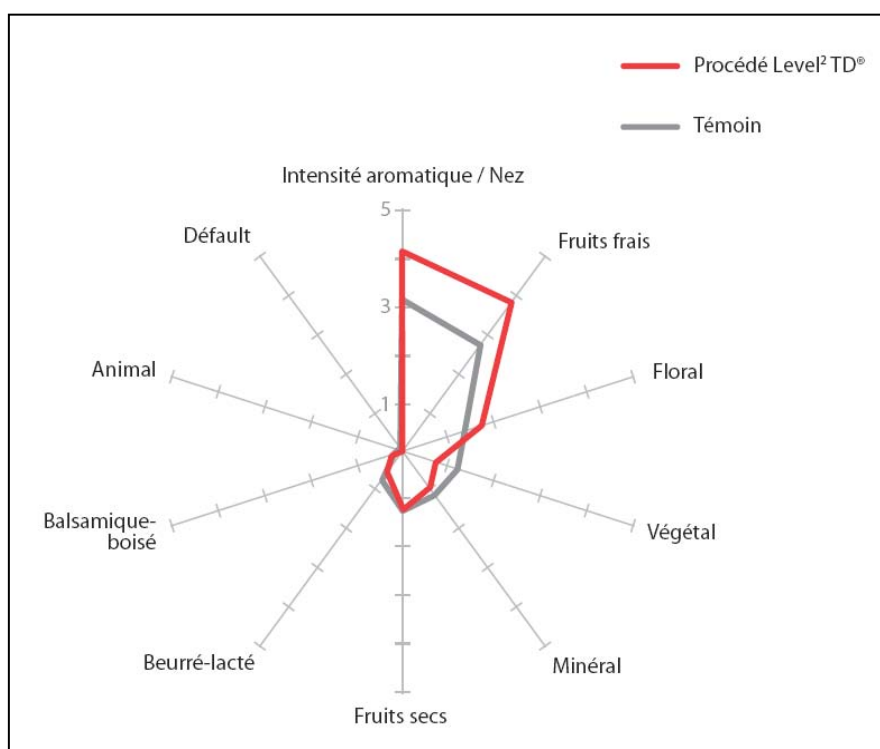


Figure I-19. Évaluation sensorielle de deux vins de maccabeu un mois après la mise en bouteille (Pillet et al., 2010)

Donc, cette approche de l'inoculation séquentielle de souche *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* peut être appliquée dans la vinification pour améliorer significativement des caractéristiques organoleptiques du vin.

I-5 Méthodologies d'études des interactions entre des levures œnologiques

Comme présenté précédemment, il existe des interactions directes et indirectes entre des levures œnologiques *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* pendant leurs co-fermentations

du vin. Donc, les méthodes d'études des interactions doivent être cohérentes et adaptées au cas étudié. En général, l'utilisation des milieux solides et liquides permet d'étudier des interactions directes, tandis que les tubes de dialyse, les supports perméables ou les bioréacteurs à membrane sont souvent utilisés pour étudier les interactions indirectes.

I-5-1 Pour les interactions directes

En milieu gélosé et en milieu liquide

L'utilisation des milieux solides permet de faciliter la distinction entre les populations mises en jeu. Cette analyse ne peut être envisagée que pour une description du phénomène, par exemple killer-sensible. Il est quasiment impossible de pouvoir déterminer la nature exacte de l'interaction. L'utilisation des milieux liquides permet par contre d'étudier des interactions plus proches de la réalité, mais leur utilisation peut être limitée par la capacité à discerner chacune des populations et des composants produits par chaque population, notamment lorsque l'on travaille au niveau des souches d'une même espèce.

L'utilisation des croissances séquentielles peut permettre de s'affranchir de cette difficulté. Il s'agit d'étudier l'impact de la croissance préalable d'une composante sur celle de la seconde introduite après la première. Cette méthode est particulièrement intéressante en œnologie lorsque l'on étudie des interactions entre des populations qui interviennent à différents moments de la vinification. C'est par exemple le cas pour l'étude de compatibilité des souches de non-*Saccharomyces* au début de la FA et de *S. cerevisiae* au reste de FA.

I-5-2 Pour les interactions indirectes

L'utilisation des tubes de dialyse, des supports perméables ou des bioréacteurs à membrane permet généralement d'étudier des interactions lorsque la présence simultanée des deux composantes est requise. La séparation peut se faire à l'aide d'une membrane filtrante qui assure le passage des composés chimiques et l'homogénéité du milieu dans les deux compartiments, tout en retenant de part et d'autre les populations mises en jeu.

I-5-2-1 Tubes de dialyse et supports perméables

Les tubes de dialyse et les supports perméables sont des outils simples pour étudier les interactions indirectes entre deux microorganismes. Ces outils fonctionnent sur la perméabilité naturelle de la membrane qui sépare deux microorganismes dans deux tubes (tubes dialyses) ou deux compartiments (supports perméable Transwell® de Corning, Etats Unis ; cf. Figure I-20), en laissant passer seulement les composés du milieu fermentaire. Les

tubes de dialyse se composent d'un tube de dialyse à l'intérieur d'un autre tube. L'insert de Transwell® possède une membrane microporeuse qui permet de séparer les micro-organismes dans 2 compartiments différents, mais remplis d'un milieu commun homogène. Les caractéristiques des supports perméables de Transwell® sont présentées dans le Tableau I-13. L'avantage de cet outil réside dans sa simplicité d'utilisation. Cependant, il est dépendant de la perméabilité membranaire qui est souvent atténuée quand la biomasse est élevée ou que des métabolites sont produits en grandes quantités.

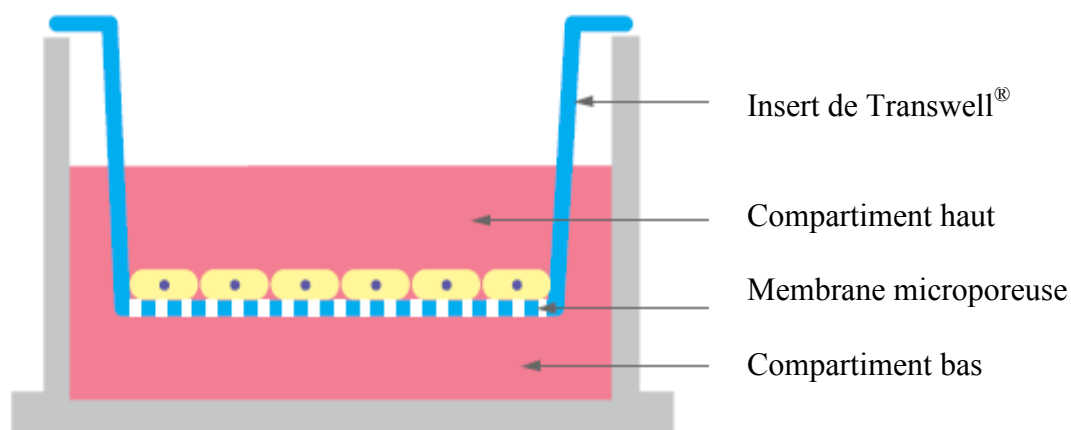


Figure I-20. Schéma d'un support perméable de Transwell®

Tableau I-13. Caractéristiques des supports perméables de Transwell®

Caractéristiques	Polyester(PET)	Polycarbonate	PTFE/Collagène
Propriétés Optique	Clair	Translucide	Clair quand mouillé
Visibilité de cellule	Bien	Faible	Cellules contours
Tissue de culture traitée	Oui	Oui	Non
Épaisseur membranaire	10 µm	10 µm	50 µm
Matrix/ECM perméable	Oui	Oui	Oui
Collagène traitée	Non	Non	Oui
Pores tailles disponibles (µm)	0,4 ; 1,0 ; 3,0 ; 8,0	0,4 ; 3,0 ; 5,0 ; 8,0	0,4 ; 3,0

I-5-2-2 Bioréacteurs à membrane à fibres creuses (BRM)

Depuis dix ans, pour étudier les interactions indirectes lors de co-cultures de microorganismes le dispositif BRM (cf Figure I-21) a été conçu et développé au laboratoire de Génie Chimique (Salgado, 2000 ; Albasi et al., 1998 et 2002). Il permet de séparer deux micro-organismes dans deux réacteurs différents qui échangent régulièrement le milieu fermentaire grâce à un module membranaire et un système automatique d'électrovannes (voir

en détail le fonctionnement de ce BRM dans la session II.2.1.1.3 du chapitre Matériel et Méthodes). Une pression alternative du gaz de tête d'un réacteur permet de faire passer dans l'autre réacteur une partie du milieu à travers un module de fibres creuses.

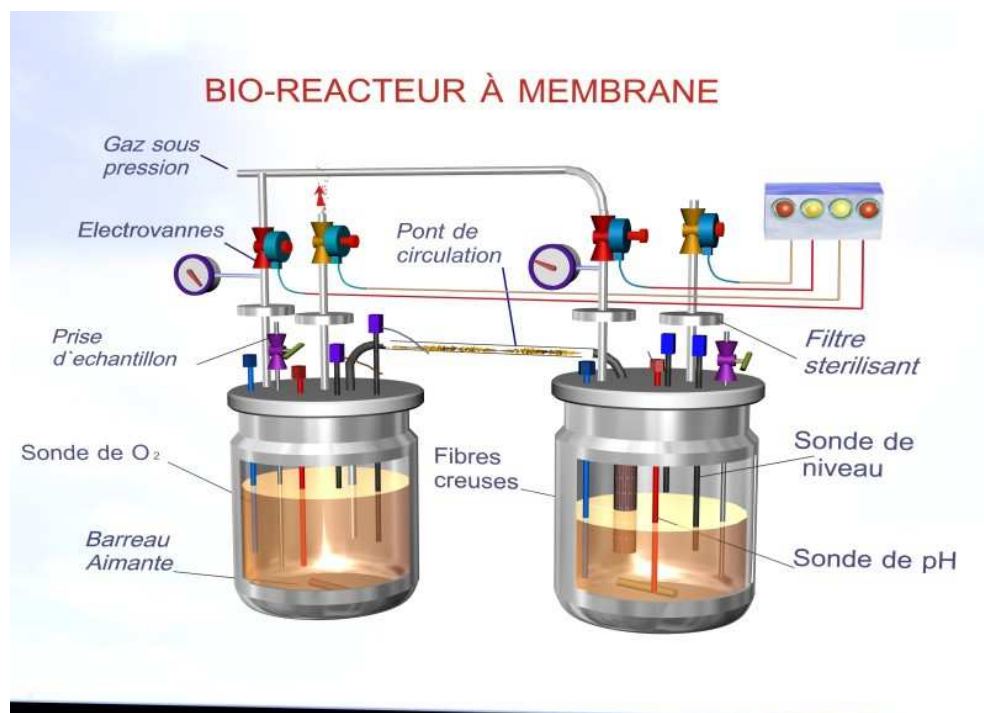


Figure I-21. Bioréacteur à membrane pour l'étude de cultures mixtes de micro-organismes

Grâce à ce système de BRM, plusieurs interactions indirectes entre microorganismes œnologiques ont été analysées : bactéries – bactéries ; levures – levures et bactéries – levures (Albasi et al., 1998 ; 2002, Salgado, 2000 ; Tataridis, 2001 ; Pommier et al., 2005 ; Nehmé, 2008). Par exemple, l'interaction de type amensalisme entre une souche *S. cerevisiae* K1 killer et une souche *Kluiveromyces marxianus* sensible a été mise en évidence dans un travail de Salgado et al., en 2000. Pommier et al., en 2005, ont présenté un modèle pour l'interaction de type amensalisme entre une souche *S. cerevisiae* K1 killer et une souche *S. cerevisiae* S6 sensible. Récemment, Nemhé en 2008 a montré l'effet inhibiteur de levures *S. cerevisiae* sur la démalication par une bactérie malolactique *O. oeni* en culture mixte. Cette inhibition qui peut aller jusqu'à réduire la vitesse de démalication de 25 % est causée par la production d'un peptide (5 – 10 KDa).

I-6 Conclusion

Cette revue bibliographique sur l'utilisation de levures *non-Saccharomyces* pour la fermentation alcoolique en vinification a mis en évidence plusieurs points :

Les levures *Torulaspota delbrueckii* semblent réellement produire des profils aromatiques fermentaires intéressants pour la qualité organoleptique du vin et différents de ceux des souches *Saccharomyces* traditionnellement utilisées en vinification.

Le niveau de développement et l'activité fermentaire de ces levures *Torulaspota Delbrueckii* dans un mout de raisin est variable suivant les souches et les conditions de culture. L'effet de l'oxygène notamment n'est pas clair, certaines études ayant mises en évidence des besoins très importants de cette levure pour son développement, d'autres au contraire ayant montré que des quantités modestes d'oxygène pouvaient suffire à condition que la levure ne soit pas en anaérobiose.

L'utilisation des levures *Torulaspota delbrueckii* en vinification ne semble envisageable qu'en association avec une (ou des) souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* assurant l'achèvement de la fermentation alcoolique dans des délais raisonnables. Se pose alors la question des interactions entre ces populations et ce qui en découle d'un point de vue applicatif, la stratégie d'inoculation en termes de quantités et de moment d'ensemencement (co-inoculation, inoculation séquentielle ?). Les études réalisées sur les interactions entre ces deux espèces sont assez peu nombreuses, surtout d'un point de vue de la quantification de l'interaction.

L'influence du milieu sur le développement de ces deux populations est également peu étudiée. Pourtant, on peut supposer qu'il y ait compétition entre les deux espèces vis-à-vis de certains constituants limitants comme ce peut être parfois le cas de l'azote, de vitamines ou d'oligo-éléments dans un milieu comme le mout de raisins.

A partir de ces constatations bibliographiques, nous avons donc choisi dans un premier temps de caractériser l'effet de l'oxygène sur la souche de *Torulaspota Delbrueckii* utilisée dans cette étude. Cette souche a donc été étudiée en fermentations pures dans un milieu synthétique proche du moût de raisins, avec des niveaux d'aérations assez larges afin de mieux connaître l'effet de ce paramètre sur le métabolisme de la souche.

Par la suite, nous nous intéresserons aux interactions au cours de la fermentation alcoolique entre une souche *Saccharomyces cerevisiae* et notre souche de *Torulaspota Delbrueckii*. La stratégie d'inoculation et l'influence de la concentration en azote dans le milieu ont été les deux paramètres étudiés. Le bioréacteur à membrane présenté dans cette partie bibliographique a semblé être un outil bien adapté pour cette tâche et a été utilisé.

CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1 Matériel

II-1-1 Micro-organismes

Les souches de levure *S. cerevisiae* S1 et *T. delbrueckii* NSC123 (lot 1 et lot 2, produit en 2007 et 2008, respectivement) sont fournies par LALLEMAND S.A.S – France sous formes de poudre de levures sèches actives. La souche *T. delbrueckii* NSC lot 2 est différente du lot 1 par sa teneur en azote et son taux massique de population (cf. Tableau II-1).

Tableau II-1. Différences principales entre *T. delbrueckii* lot 1 et lot 2

	<i>T. delbrueckii</i> NSC lot 1 (2007)	<i>T. delbrueckii</i> NSC lot 2 (2008)
Protéines	27 %	39 %
Matières solides	92 %	90 %
Cellules viables /g	6,44 x 10 ¹⁰	2,00 x 10 ¹⁰
Cellules totales /g	9,76 x 10 ¹⁰	4,39 x 10 ¹⁰

II-1-2 Milieux de cultures

Tous les acides L- α aminés, le glucose et le fructose ainsi que les sels minéraux utilisés dans la préparation des milieux de culture ont été fournis par Sigma-Aldrich, Inc. (Saint Louis, Etats-Unis). L'extrait de levure a été fourni par Oxoid (Hampshire-Angleterre) et la peptone par Biokar (Beauvais-France).

Le Milieu MS300 défini par Salmon et Barre, (1998) est utilisé pour la plupart des fermentations de cette étude. Sa composition est présentée dans le Tableau II-2. La stérilisation se fait à 114 °C, pendant 15 min. Les acides L- α aminés mélangés avec les oligoéléments et l'azote ammonium (fraction 2) sont stérilisés à part de la fraction 1 contenant le mélange des sucres, des acides et des minéraux ajoutés pour éviter les réactions de Maillard. Pour éviter leur dénaturation, les vitamines sont filtrées par membrane de 0,2 μ m avant d'être ajoutées dans le milieu composé des fractions 1 et 2. Dans les fermentations en BRM, ce milieu doit être mélangé pendant 4 h à 6 h pour qu'il soit totalement homogénéisé avant l'inoculation des levures. Il en résulte un milieu MS300 contenant environ 120 mgN ammonium/L et 200 mgN α -aminés/L, soit au total 320 mg d'azote assimilable/L.

Les milieux **MS170** et **MS30** sont identiques au MS300 excepté pour la teneur en azote assimilable : respectivement 7,4 mL/L et 1 mL/L de solution mère d'acides L- α aminés (contre 13,09 ml pour MS300) et 0,26 g/l et 0 g/l de NH₄Cl (contre 0,46 g/L pour MS300). Tous les autres composés sont identiques au MS300. Donc, globalement, MS170 contient 180 mg d'azote assimilable/L et MS30 seulement 20 mgN α -aminés/L.

Tableau II-2. Composition du MS300 (Annexes 01-04)

Fraction 1 (H ₂ O : 500 mL)	Fraction 2 (H ₂ O : 500 mL)	Fraction 3
- Sucre (g/L) Glucose : 110 Fructose : 110 - Acides (g/L) Acide L-malique : 6 Acide citrique : 6 - Minéraux (g/L) KH ₂ PO ₄ : 0,75 K ₂ SO ₄ : 0,50 MgSO ₄ , 7 H ₂ O : 0,25 CaCl ₂ , 2H ₂ O : 0,155 NaCl : 0,20 - pH ajusté à 3,3 par NaOH 10N	- Azote (g/L) : NH ₄ Cl : 0,46 - 1 mL/L de solution mère d'Oligoéléments (g/L) MnSO ₄ , H ₂ O : 4; ZnSO ₄ , 7 H ₂ O : 4; CuSO ₄ , 5 H ₂ O : 1; KI : 1; CoCl ₂ , 6 H ₂ O : 0,4; H ₃ BO ₃ : 1 et (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ : 1 - 1 mL/L de solution mère de Facteurs anaérobies (g/100 mL) Ergostérol : 1,5 g; Acide oléique : 0,5 mL; Ajouter le mélange 50/50 v/v de Tween 80 et éthanol pur pour 100 mL, Tween 80 : 50 mL ; éthanol pur: 50 mL - 13,09 mL/L de solution mère des acides L-α aminés. Les acides L-α aminés sont au nombre de 19 (Annexe 01). - pH ajusté à 3,3 par H ₂ SO ₄ 2N	- 10 mL/L de solution mère des Vitamines (g/L) Myo-Inositol : 2 Pantothénate de calcium : 0,15 Thiamine hydrochloride : 0,025 Acide nicotinique : 0,2 Pyridoxine : 0,025 Biotine : 3 mL

II-2 Méthodes

II-2-1 Conduite des fermentations

II-2-1-1 Cultures pures dans différentes conditions

Les fermentations pures des levures ont été d'abord étudiées dans différentes conditions : en Erlen-meyers, en bio-fermenteurs et bioréacteurs à membrane. Dans toutes les fermentations pures, le taux d'inoculation est de 0,25 g/L (15 x 10⁶ cellules vivantes/mL) pour *T. delbrueckii* NSC123 lot 1 ; 0,5 g/L (10 x 10⁶ cellules vivantes/mL) pour lot 2 et 0,25 g/L (5 x 10⁶ cellules vivantes/mL) pour *S. cerevisiae* S1. Les fermentations sont réalisées à 20 °C. Les échantillons sont prélevés régulièrement chaque 4 heures, centrifugés à 11500 tours/minute pendant 15 minutes à 0 °C et enfin stockées dans le congélateur à -20 °C pour les analyses ultérieures. Les fermentations ont été considérées terminées (et arrêtées) lorsque 97 % des sucres initiaux étaient consommés.

II-2-1-1-1 Fermentations en Erlen-Meyers

Dans des Erlen-Meyers de 500 mL, 400 mL de milieu MS300 était homogénéisé par un barreau aimanté tournant à 250 tours/minute dans un incubateur à 20 °C. Les Erlen-Meyers

sont pesés avant et après chaque prélèvement pour déterminer la cinétique de production de CO₂ dans chaque FA.

II-2-1-1-2 Fermentations en bio-fermenteurs (NBS)

Dans le bio-fermenteur (cf Figure II-1) le milieu est mélangé par un agitateur mécanique à 250 tours/mn. La température est régulée à 20 °C par un système de refroidissement et de chauffage automatique. Il est également aéré (ou désaéré) par un débit d'air (ou d'azote) contrôlé par débitmètre massique. Le débit d'air est compté par rapport au volume du milieu dans le bio-fermenteur (0 ; 0,3 ; 0,6 et 1 litre d'air par litre de milieu). La présence d'oxygène dissous dans le milieu est mesurée grâce à une sonde de pO₂. Deux analyseurs de gaz placés en sortie permettent de mesurer la composition du gaz de sortie en oxygène et en dioxyde de carbone. Le pH du milieu est mesuré en ligne par une sonde. Un logiciel de contrôle et d'acquisition permet le suivi de la FA en temps réel, les valeurs des paramètres étant enregistrées toutes les 6 minutes. Le logiciel utilisé est Bio Flo 110 Fermentor/Bioreactor, Bio-Command Plus, NBS Bio Command, version plus (BioProcessing Software). Il permet l'acquisition des données et la commande simultanée et automatique de quatre fermenteurs identiques.

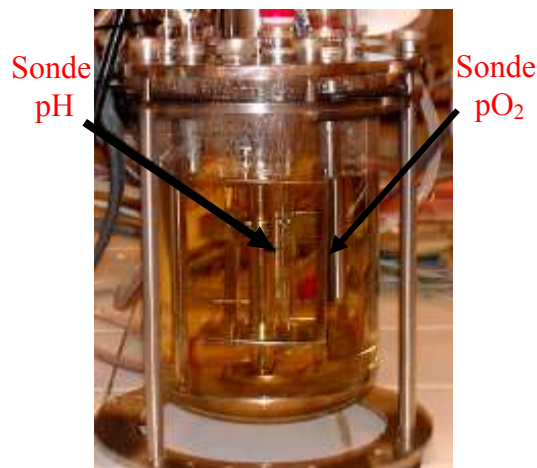


Figure II-1. Fermenteur type New Brunswick Scientific (NBS)

II-2-1-1-3 Fermentations en bioréacteur à membrane (BRM)

Comme cela a été expliqué dans la partie bibliographie, un BRM (cf Figure II-2) a été choisi pour réaliser des études cinétiques quantitatives sur les cultures mixtes. Il est composé de deux compartiments où chacune des levures sera cultivée séparément. Une membrane de filtration à fibres creuses de 0,1 μm permet le passage du milieu liquide entre les compartiments mais pas des levures.



Figure II-2. FA séquentielle en BRM de *T. delbrueckii* NSC123 lot 2 et *S. cerevisiae* S1

Tableau II-3. Caractéristiques du module de filtration du BRM

Diamètre nominal des pores	0,1 μm
Diamètre interne des fibres	0,25 mm
Diamètre externe des fibres	0,43 mm
Nombre de fibres	1314
Longueur utile des fibres	0,09 m
Surface interne	0,107 m^2
Surface externe	0,156 m^2
Perméabilité à l'eau (mesuré dans le réacteur à 30 °C)	$3,7 \times 10^{-12}$ m

La circulation du milieu au travers de cette membrane est assurée par une surpression (de 0,4 à 0,7 bar) et contrôlée par des sondes à niveau pour assurer un volume d'échange de 150 mL toutes les 30 secondes environ. De l'azote comprimé est introduit alternativement dans l'espace de tête d'un réservoir puis de l'autre, l'autre réservoir restant ouvert à l'atmosphère. Ceci permet de réaliser les surpressions nécessaires à la circulation du liquide d'un bac vers

l'autre. L'entrée et la sortie du gaz sont contrôlées par un couple d'électrovannes. Celle contrôlant l'entrée est normalement (hors tension) fermée, alors que celle qui contrôle la sortie est normalement ouverte. Un dispositif permet de basculer la mise sous tension entre les deux couples de vannes en fonction du niveau de liquide dans les deux réservoirs. Le niveau maximum est fixé pour chacun des réservoirs par deux sondes de niveau en acier inoxydable : lorsque les deux sondes sont en contact avec le liquide, le système de contrôle fait basculer la mise sous tension des vannes. Les vannes qui étaient ouvertes se ferment et celles qui étaient fermées s'ouvrent. La stérilité du gaz entrant est assurée par filtration sur des membranes hydrophobes en Téflon, de seuil de coupure de 0,2 µm. Le module de filtration à fibres creuses est fourni par la société Polymem SA (Fourquevaux, France). Les fibres en polysulfone sont en forme de U et maintenues ensemble à la base par une résine Epoxy. La base du module est confinée dans un réceptacle métallique et la partie filtrante est en immersion dans le milieu de culture. Les caractéristiques du module de filtration sont présentées dans le Tableau II-3 (Tataridis Panagiotis, 2001).

De ce fait, la FA se fait obligatoirement sous azote et donc en anaérobiose stricte. Afin d'apporter un peu d'oxygène aux levures, des bullages en oxygène peuvent être réalisées. La présence d'oxygène dissous et le pH du milieu sont mesurés. Le milieu est mélangé à 250 rpm par un barreau aimanté dans chacun des compartiments d'une capacité de 2,5 L chacun et la température est maintenue à 20 °C.

II-2-1-2 Co-cultures (fermentations mixtes en contact indirect) en BRM

Les co-cultures des levures *S. cerevisiae* S1 et *T. delbrueckii* NSC123 lot 1 ou lot 2 ont été réalisées en BRM. Dans ces fermentations, *Torulasporea* et *Saccharomyces* sont inoculées séparément, chacune dans un réservoir différent.

II-2-1-2-1 Fermentations séquentielles en BRM

La levure *T. delbrueckii* NSC123 lot 2 est inoculée à 0,5 g/l (équivalent à 10^7 cellules vivantes/mL) dans le réservoir contenant le module de membrane 48 h avant inoculation de *S. cerevisiae* S1 à 0,25 g/L (équivalent à 5×10^6 cellules vivantes/mL). Pour les fermentations séquentielles de *T. delbrueckii* NSC123 lot 1, le taux d'inoculation de cette levure était de 0,25 g/L et celui de *S. cerevisiae* S1 est resté le même.

II-2-1-2-2 Fermentations mixtes en BRM

Les fermentations mixtes de *T. delbrueckii* NSC123 lot 2 et *S. cerevisiae* S1 correspondant à une inoculation simultanée des deux levures, chacune dans un compartiment. Deux ratios d'inoculation *Torulasporea/Sacharomyces* ont été testées: un ratio d'inoculation de 2 dit bas correspondant à 0,5 g/L de *T. delbrueckii* NSC123 lot 2 (10^7 cellules vivantes/mL) et 0,25 g/l (5×10^6 cellules vivantes/mL) de *S. cerevisiae* S1 et un ratio de 20 dit haut correspondant à 0,5 g/L de *T. delbrueckii* NSC123 lot 2 (10^7 cellules vivantes/mL) et 0,025 g/l (5×10^5 cellules vivantes/mL) de *S. cerevisiae* S1.

II-2-2 Méthodes analytiques

Au cours des fermentations, les échantillons sont prélevés aseptiquement chaque quatre heures pour d'une part déterminer la croissance cellulaire et pour d'autre part analyser la composition du milieu fermenté. Après mesure de la densité optique et comptage au microscope pour déterminer la population levurienne, ils sont centrifugés à 11500 rpm pendant 15 min à 0 °C. Le poids sec est déterminé à partir des culots cellulaires et les surnageants sont stockés au congélateur à -20 °C pour les analyses ultérieures.

II-2-2-1 Enumération des cellules sous microscopes

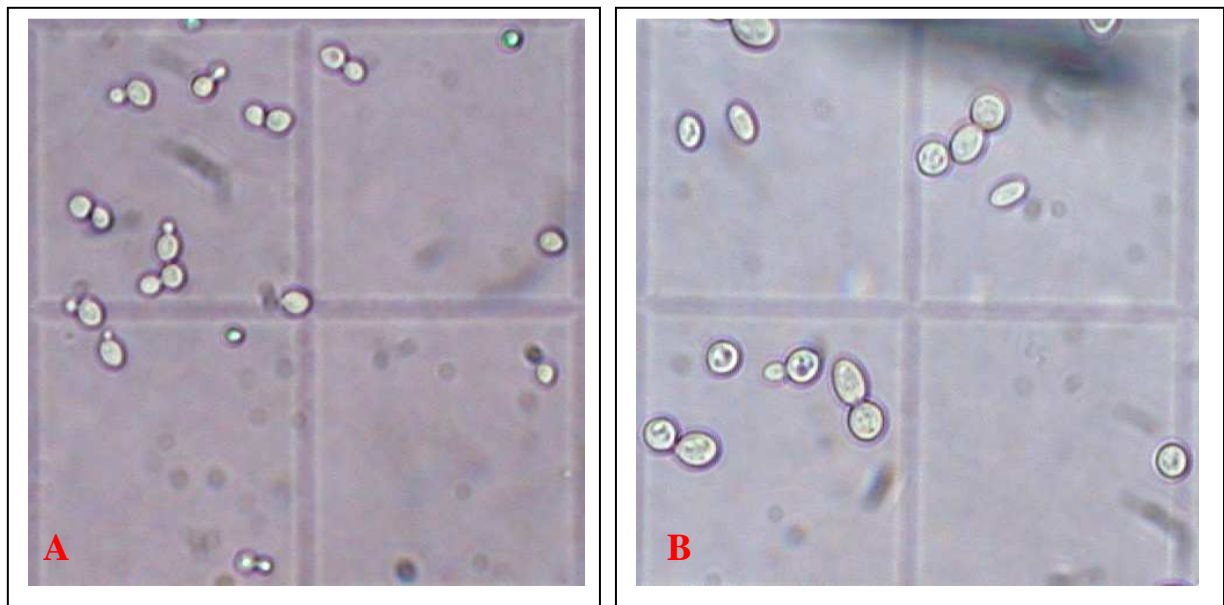


Figure II-3. Cellules des *T. delbrueckii* NSC lot 2 (A) et *S. cerevisiae* S1 (B)

Pour l'énumération des cellules de levures totales et vivantes sous le microscope (cf Figure II-3), l'hématocymètre de Thomas est utilisé. Pour les cellules totales, l'échantillon est

mélangé volume à volume avec le bleu de méthylène (0,1 g de bleu de méthylène dans un litre de solution de citrate de sodium à 2 %) pendant 10 min avant d'être compté sous le microscope. Les cellules viables apparaissent incolores alors que les mortes sont colorées en bleu. L'erreur expérimentale est de moins de 8 % (Lange et al., 1993). Chaque comptage est réalisé à partir de 5 grands carreaux de la cellule Thomas. Pour obtenir un pourcentage d'erreur inférieur à 10 %, il faut compter au moins 150 cellules. Si on obtient un nombre inférieur à 150 il faut compter les 16 carreaux. Si au contraire on obtient un très grand nombre de cellules il faut diluer l'échantillon. Le résultat est exprimé par la formule suivante où D est le facteur de dilution.

$$X \text{ (cellules/mL)} = \frac{\text{Nombres de cellules comptées}}{\text{Nombres de grands carreaux comptés}} \times D \times 0,25 \times 10^6$$

II-2-2-2 Mesure de la densité optique

La densité optique (DO) des échantillons est mesurée à 620nm par un spectrophotomètre en utilisant une cuvette en quartz de 2 mm d'épaisseur. Pour obtenir la linéarité entre la $DO_{620\text{nm}}$ et la concentration cellulaire, il faut que la $DO_{620\text{nm}}$ soit inférieure à 0,8. Sinon, il faut le diluer. L'erreur expérimentale est au maximum de 5 %.

II-2-2-3 Mesure du poids sec des levures

Le culot des levures obtenu après la centrifugation de chaque échantillon est re-suspendu dans l'eau pour éliminer les composés résiduels et ensuite centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le nouveau culot obtenu est dilué dans 10 mL d'eau stérile avant d'être passé à la thermo-balance (Precisa, Dietikon-Suisse) qui évapore l'eau dans l'échantillon par ondes infrarouges et mesure le poids de l'échantillon sec. L'erreur expérimentale est au maximum de 5 %. Le résultat permet l'établissement des corrélations Poids sec = $f(DO_{620\text{nm}})$ pour chacune des souches. Les corrélations entre le poids sec et $DO_{620\text{nm}}$ de *T. delbrueckii* NSC123 lot 1, lot 2 et *S. cerevisiae* S1 sont présentées dans la Figure II-4. Ces corrélations seront utilisées pour convertir les cinétiques de $DO_{620\text{nm}}$ en poids sec dans toutes les FA.

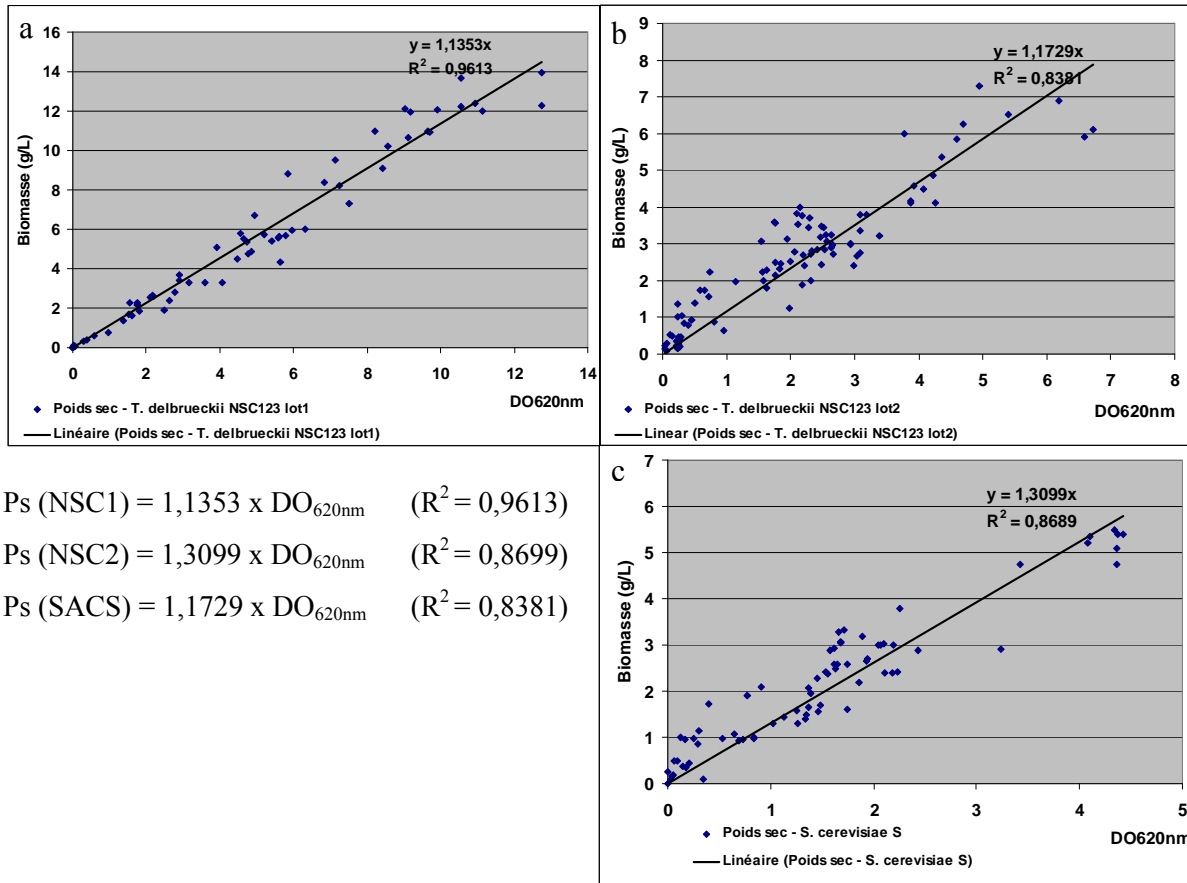


Figure II-4. Corrélations entre les poids secs et les DO_{620nm} des levures (a : *T. delbrueckii* NSC123 lot 1, b : lot 2 et c : *S. cerevisiae* S1)

II-2-2-4 Dosage du sucre restant dans le milieu par la méthode du DNS

Le sucre résiduel dans les échantillons est mesuré par la méthode de DNS (acide Di-Nitro-3,5 Salicylique) établie par Miller (1959). Le principe de cette méthode est la réaction de réduction du sucre avec le DNS, donnant un produit orangé (3-amino-5-nitrosalicylique) à 540nm. En conséquence, l'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en sucres. La composition du réactif de DNS est la suivante : 8 g de soude, 5 g d'acide Di-Nitro-3,5 Salicylique, 150 g de tartrate double de sodium et de potassium, complété à 500 mL avec de l'eau et conservé à l'abri de la lumière. Pour effectuer un dosage de sucre par la méthode DNS, les étapes suivantes sont réalisées :

Dilution de l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit à moins de 2 g de sucre/l.

Mélange de 0,5 mL d'échantillon dilué et de 0,5 mL de réactif de DNS dans un tube d'essai de 20 mL.

Chauffage de ce mélange dans un bain marie à 100 °C, pendant 10 min, en bouchant le tube par une bille de verre.

Le mélange est immédiatement mis dans un bain de glace pour refroidissement.

Ajout de 10 mL d'eau distillée dans le mélange et vortexage pour homogénéisation.

Mesure de l'absorbance du produit à 540 nm au spectrophotomètre.

Avant les échantillons, il faut passer un gamme d'étalon de 0 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 et 2 g de sucre (50 % de glucose : 50 % de fructose)/L pour établir la corrélation entre la teneur de sucre et la DO mesurée. L'erreur expérimentale est inférieure à 4 %.

II-2-2-5 Dosage du glucose restant dans le milieu par

La teneur du glucose dans les échantillons est mesurée enzymatiquement par la machine automatique modèle 2700 nommée YSI (Yellow Spring Instrument Inc., Yellow Spring, Ohio, USA). L'appareil utilise une enzyme, la glucose oxydase, immobilisée sur une membrane qui est couplée à une sonde électrochimique. L'enzyme permet la production du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à partir de la réaction du glucose avec l'oxygène :



La réaction d'oxydation du peroxyde d'hydrogène via une anode de platine libère alors un flux d'électrons proportionnel à la concentration en glucose de la solution dosée. La réponse de l'appareil est linéaire entre 0,002 et 25 g/L de glucose, avec une erreur maximale de ± 3 % par rapport à une solution standard de glucose à 25 g/L (CAS 50997).

II-2-2-6 Dosage du glycérol et de l'éthanol par HPLC

Les concentrations d'éthanol et de glycérol sont mesurées par un HPLC (TSP Spectra System) ayant une colonne (Biorad Aminex HXP-87H) spécifique pour la séparation des alcools, acides organiques et des sucres. La phase mobile est de l'acide sulfurique 0,05 N avec un débit de 0,4 mL/min. La température de la colonne est fixée à 40 °C et le volume de la boucle d'injection est de 20 µl. Un réfractomètre différentiel (TSP RefractoMonitor V) en sortie de la colonne de HPLC détecte l'éthanol et le glycérol. Le calcul de la surface des pics détectés est réalisé par un logiciel (Borwin V 1.2) qui permet de déduire la concentration de chaque composant grâce à une gamme étalon d'éthanol (0 - 100 g/l) et de glycérol (0 - 10 g/l). L'erreur expérimentale est de moins de 5 %.

II-2-2-7 Dosages enzymatiques au ‘Mascott’ (Lisabio, Morangis-France)

Le ‘Mascott’ est une machine permettant de réaliser de façon automatisé des dosages enzymatiques. Cette machine est équipée d’une pompe péristaltique pour mélanger les réactifs enzymatiques avec l’échantillon (460 µl pipeté dans un godet). Un spectrophotomètre mesure l’absorbance du mélange après réaction dans ce godet. Une aiguille automatisée permet de prélever et injecter les quantités précises de réactifs. Une gamme étalon pour chaque type de dosage est préalablement réalisée et enregistrée dans le programme de dosage correspondant. Les différentes concentrations de la molécule dosée (substrat ou produit) sont calculées par rapport à la gamme étalon et directement affichées sur l’écran de la machine. De nombreux kits sont disponibles dans le commerce pour réaliser le dosage enzymatique de différents produits

II-2-2-7-1 Dosage enzymatique de l’acide L-malique : principe et protocole de ce dosage

La composition du kit est présentée dans le Tableau II-4.

Tableau II-4. Préparation du mono réactif pour le dosage de l’acide L-malique

Composition du kit (Microdom, kit no 110 05 011 00)	Reconstitution du mono réactif
Flacon 1 (30 mL) : Tampon en solution. Flacon 2 (6 mL) : NAD ⁺ en solution. Flacon 3 (0,8 mL) : Suspension de GOT Flacon 4 (0,8 mL) : Suspension de L-MDH Flacon 5 (4 mL) : solution standard d’acide malique 0,2 g/L.	(Pour 20 mL de réactif de travail) : 5 mL du flacon 1 1 mL du flacon 2 0,13 mL du flacon 3 0,13 mL du flacon 4 14 mL d’eau distillée. Ce mono-réactif se conserve pendant 3 jours entre 4 et 6 °C.

En présence de nicotinamide-adenine-dinucléotide (NAD⁺), l’acide L-malique est oxydé en oxaloacétate par la L-malate déshydrogénase (L-MDH) dans la réaction (1). L’équilibre de la réaction est situé du côté du malate.



En éliminant l’oxaloacétate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens L-malate oxaloacétate. En présence du L-glutamate, l’oxaloacétate est transformé en L-aspartate par le glutamate – oxaloacétate-transaminase (GOT) dans la réaction (2).



La formation de NADH,H^+ est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, proportionnelle à la quantité de L-malate consommée. Une gamme étalon d'acide L-malique allant de 0 à 6 g/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide. L'erreur expérimentale est inférieure à 4 %.

II-2-2-7-2 Dosage enzymatique de l'acide L-lactique : principe et protocole de ce dosage

La composition du kit est présentée dans le Tableau II-5.

L'acide L-Lactique est oxydé en pyruvate par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH), en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD^+). L'équilibre de la réaction se situe du côté du lactate. La réaction (1) est orientée dans le sens du lactate en pyruvate par l'élimination du pyruvate du milieu réactionnel. Le pyruvate est enfin transformé en L-alanine grâce à la glutamate-pyruvate transaminase (GP), en présence du L-glutamate (2).

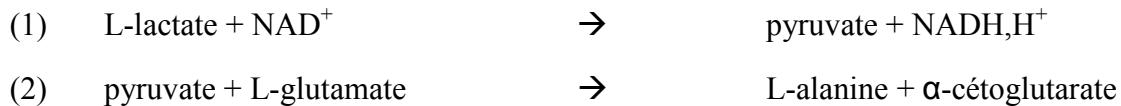


Tableau II-5. Préparation du mono réactif pour le dosage de l'acide L-lactique

Composition du kit (Microdom, kit no 110 05 020 00)	Reconstitution des réactifs
Flacon 1 : Tampon Flacon 2 : GPT lyophilisé Flacon 3 : Suspension de L-LDH	Dissoudre 3 flacons de GPT lyophilisé avec 2 mL de tampon chacun et puis les mélanger. Ajouter 60 μL de L-LDH. Ajouter 12 mL d'eau déminéralisée. Durée de conservation : 3 jours.

La formation de NADH,H^+ , mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de L-lactate consommée. Une gamme étalon d'acide L-lactique allant de 0 à 4 g/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide. L'erreur expérimentale est inférieure à 4 %.

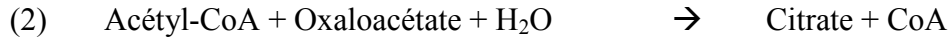
II-2-2-7-3 Dosage enzymatique de l'acide acétique : principe et protocole de ce dosage

La composition du kit est présentée dans le Tableau II-6.

L'acide acétique est converti en acétyl-CoA en présence de l'acétyl-CoA synthétase (ACS), de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) et du coenzyme A (CoA) (1).



L'acétyl-CoA réagit avec l'oxaloacétate pour donner du citrate en présence de la citrate synthase (CS) (2).



L'oxaloacétate requis pour la réaction (2) est formé à partir du L-malate et du nicotinamideadénine - dinucléotide (NAD^+) en présence de la L-malate déshydrogénase (L-MDH) (3). Dans cette réaction le NAD^+ est réduit en NADH, H^+ .

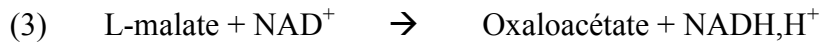


Tableau II-6. Préparation du double réactif pour le dosage de l'acide acétique

Composition du kit (Boehringer Mannheim kit nO 10 148 261 035)	Reconstitution des réactifs de travail
Flacon 1 : tampon triéthanolamine pH = 8,4, acide L-malique (134 mg), chlorure de magnésium (67 mg) contenus tous dans un volume de 32 mL Flacon 2 : 280 mg de lyophilisat contenant : ATP (175 mg), CoA (18 mg), NAD^+ (86 mg) Flacon 3 : 0,4 mL de suspension contenant : L-MDH (1100 U), citrate synthase (270 U) Flacon 4 : 3 flacons de lyophilisat d'acétyl-CoA synthétase (5 U)	Réactif 1 : 10 mL du flacon 1 Le contenu du flacon 2 est dissous avec 7 mL d'eau distillée et le contenu du flacon 4 est dissous avec 4 mL d'eau distillée. Réactif 2 : 4 mL du flacon 4 et 2,3 mL du flacon 2 et 0,133 mL du flacon 3

Le dosage est basé sur la formation de NADH, H^+ mesuré par l'augmentation de l'absorbance à 340nm et qui est indirectement proportionnelle à la concentration d'acide acétique consommé. Une gamme étalon d'acide acétique allant de 0 g/l à 1 g/l a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide. L'erreur expérimentale est inférieure à 4 %.

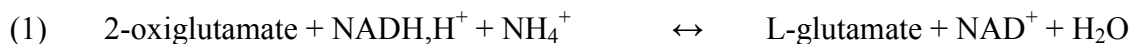
II-2-2-7-4 Dosage de l'azote d'ammonium (NH_4^+) : Principe et protocole du dosage

La composition du kit est présentée dans le Tableau II-7.

Tableau II-7. Préparation des réactifs pour le dosage de l'azote ammoniacal

Composition du kit (Microdom no 110 05 037 00)	Reconstitution du mono-réactif
2 flacons contenant chacun 50 mL de diluant du chromogène. 1 flacon contenant 2,7 mL de chromogène (NADH,H^+) 2 flacons contenant chacun 50 mL de solution de blanc échantillon. 1 flacon contenant 5,5 mL de starter (glutamate déshydrogénase) 1 flacon de 10 mL d'une solution étalon de 50 mg/L d'azote ammoniacal.	Pour un volume réactionnel de 21 mL : 0,25 mL de chromogène 10 mL de diluant chromogène 10 mL de solution blanc échantillon 0,5 mL de starter Conservation pendant 2 semaines entre 4 et 8 °C

En présence de la glutamate déshydrogénase (GIDH), de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NADH,H^+), l'azote ammoniacal est transformé en L-glutamate par le 2-oxoglutarate qui oxyde la NADH,H^+ (1).



La détermination est basée sur la formation de NAD^+ . La diminution de l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 340 nm. La quantité de NADH,H^+ oxydée en NAD^+ au cours de la réaction est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque (azote ammoniacal). Une gamme étalon d'azote ammoniacal allant de 0 à 50 mg/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide. L'erreur expérimentale est au maximum de 5 %.

II-2-2-7-5 Dosage de l'azote alpha aminé : Principe et protocole du dosage

La composition du kit est présentée dans le Tableau II-8.

Tableau II-8. Préparation des réactifs pour le dosage de l'azote alpha-aminé

Composition du kit (Microdom kit no 110 10 110 00)	Reconstitution des réactifs de travail
Flacon 1 : Tampon soude + acide borique + NAC (25 mL) Flacon 2 : solution hydro-alcoolique d'OPA (20 mL) Flacon 3 : NAC (5 microtubes)	Réactif 1 : 25 mL R1 + 1 microtube (Conservation 1 semaine à 4°C) Réactif 2 : réactif prêt à l'emploi (Conservation 3 mois à 4°C)

En présence d'o-phthaldialdehyde/N-acétyl-L-cystéine (OPA/NAC), les groupements d'acides aminés primaires réagissent pour former des dérivés d'isoindole stables à la longueur d'onde de 340 nm. C'est un dosage colorimétrique automatisé au MASCOTT effectué avec le kit de MicroDom (Ref. 110 10 100 00). Grâce à une droite d'étalonnage d'azote alpha-aminé allant de 0 à 80 mg/L préalablement introduite au programme de dosage de cet acide, la concentration (exprimée en g/L) s'affiche à l'écran. L'erreur expérimentale est de moins 5 %.

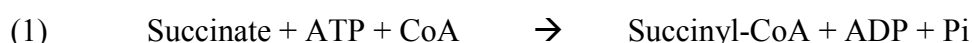
II-2-2-7-6 Dosage de l'aide succinique par un kit enzymatique.

La composition du kit est présentée dans le Tableau II-9.

Tableau II-9. Préparation des réactifs pour le dosage de l'acide succinique

Composition du kit : Cat. No. 10 176 281 035	Préparation des solutions
1. Flacon 1 : 830 mg lyophilizat contenant : tampon glycyglycine, pH environ 8,4 ; NADH, environ 6 mg 2. Flacon 2 avec 10 tablettes ; chaque tablette contenant : CoA environ 0,75 mg; ITP environ 0,7 mg; PEP-CHA environ 0.7 mg 3. Flacon 3 avec environ 0,5 mL de suspension contenant : PK environ 250 U; L-LDH environ 230 U 4. Flacon 4 avec environ 0,25 mL de suspension contenant : succinyl-CoA synthetase environ 12 U	1. Dissoudre le flacon 1 avec 13 mL d'eau redistillé. Durée de conservation 4 semaines à 2 – 8 °C. Chauffer cette solution à 37 °C avant de l'utiliser 2. Dissoudre 1 tablette dans le flacon 2 avec 1 mL de solution du flacon 1. Chauffer cette solution à 37 °C avant de l'utiliser 3. Utiliser la suspension dans le flacon 3 et flacon 4 sans les dissoudre

Il est noté que l'acide succinique a été déterminé manuellement par le kit enzymatique (BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis), Cat. No. 10 176 281 035. Le dosage automatique au Mascott n'a pas été utilisé. En présence d'adénosine-5'-triphosphate (ATP), l'acide succinique (succinate) est converti en succinyl-CoA par l'enzyme succinyl-CoA synthétase (SCS), avec la formation simultanée d'adénosine-5'-diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) (1). En présence de pyruvate kinase, l'ADP réagit avec le phosphoénolpyruvate (PEP) pour former le pyruvate et l'ATP (2). Le pyruvate produit est réduit en L-lactate par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) en présence de nicotinamide-adénine dinucléotide réduit (NADH,H⁺) avec la production de NAD⁺ (3).



La quantité de NAD^+ formé par la réaction couplée ci-dessus est stœchiométrique avec la quantité d'acide succinique. C'est la consommation de NADH,H^+ qui est mesurée par la diminution de l'absorbance à 340 nm. L'erreur expérimentale est inférieure à 5 %.

II-2-2-7-7 Dosages des esters d'acétate

Les esters d'acétate et d'éthyle des échantillons sont mesurés par la chromatographie en phase gazeuse avec le détecteur FID. Ces analyses ont été sous-traitées au laboratoire d'analyses OCEANIA. Les esters suivants ont été analysés : acétate d'éthyle, butyrate d'éthyle (Butanoate d'éthyle), acétate d'isoamyl, hexanoate d'éthyle, lactate d'éthyle, caprylate d'éthyle (Octanoate d'éthyle), décanoate d'éthyle (Caprate d'éthyle), succinate d'éthyle, laurate d'éthyle (Dodécanoate d'éthyle) et acetate d'hexyle.

II-2-2-7-8 Dosages des teneurs en C, N, O, H des biomasses

Le dosage des éléments chimiques concerne la détermination des teneurs en carbone, azote, hydrogène et oxygène des échantillons analysés. Il est réalisé par le Service – Inter - Universitaire de microanalyse Élémentaire de l'ENSIACET (Toulouse, France). Les analyseurs CHNS/O AE1110 et Flash-EA 1112 (Thermofinnigan) offrent une solution simple pour le dosage en une seule analyse des différents composés. Il s'agit de brûler un échantillon préparé dans une feuille d'étain dans un jet d'oxygène pur à 920 °C/1000 °C. La combustion «éclair» de l'échantillon à 1800 °C libère des gaz qui subissent un cycle de traitements (oxydant, réducteur ...) dans un tube réacteur et/ou pièges spécifiques. Les gaz traités sont alors séparés par une méthode chromatographique. Les analyseurs permettent de travailler avec des quantités d'échantillons variant de 0,1 mg à 1g (en fonction des analyses) pour des échantillons solides ou liquides d'origine organique, organométallique ou inorganique. Les limites de détection des différents éléments sont les suivantes (% massique) : C : 0,5 %, H : 0,6 %, N : 0,5 % et S : 0,3 %.

II-2-2-7-9 Calcul de la production de CO_2 dans les FA réalisées dans les Erlen-Meyers

Les fermentations préliminaires des levures *S. cerevisiae* S1 et *T. delbrueckii* NSC123 lot 1 ont été réalisées en Erlen-Meyers de 500 mL. Les échantillons sont prélevés régulièrement au cours des FA. Les Erlen-Meyers sont pesés avant Poids(t-1) et après Poids(t) chaque prélèvement pour déterminer la cinétique de production de CO_2 .

$$\text{CO}_2(t) = \text{CO}_2(t-1) + \frac{\text{Poids}(t-1) - \text{Poids}(t)}{\text{Volume}(t)}$$

Avec le CO_2 en g/L, le poids en g et le volume en L.

$$\text{Volume}(t) = V_0 - n * v_p$$

Avec : V_0 (0,4 L) est le volume du milieu à $t = 0$ (h), v_p (L) est le volume d'échantillon prélevé (0,012 L) et n est le nombre de prélèvement au temps t .

On obtient ainsi la quantité de CO_2 dégagé en g/L depuis le début de la FA en estimant que la perte de poids est entièrement due à la production de CO_2 (hypothèse simplificatrice acceptable étant donné les faibles quantités d'autres volatils produits devant la quantité de CO_2).

II-2-2-7-10 Calcul de la production d'éthanol dans les FA aérées dans les fermenteurs NBS

Les fermentations réalisées avec aération d'air de 0,3 vvm ; 0,6 vvm et 1 vvm ont introduit une évaporation considérable au cours des FA. Ainsi pour un volume initial de 1,8 L, les volumes finaux ont été seulement de 1,8 ; 1,75 ; 1,7 et 1,65 L au temps final pour les aérations de 0 ; 0,3 ; 0,6 et 1 vvm, respectivement. Ce volume évaporé est composé des solutés volatils du milieu fermentaire. Nous avons supposé que l'eau et l'éthanol ont constitué la majorité de ces composés. Les autres composés volatiles ont été certainement aussi présents dans le volume évaporé mais leurs quantités relativement faibles sont supposées négligeables par rapport à ces deux composés majeurs. Pour exploiter les données de fermentation, il est nécessaire d'avoir accès à la quantité d'éthanol produite. Pour cela, il faut donc évaluer la concentration d'éthanol dans la phase liquide (par dosage) mais également avoir la concentration dans la phase gazeuse. Il est difficile d'avoir accès à cette dernière par mesure expérimentale c'est pourquoi elle a été calculé avec un modèle mathématique. L'hypothèse effectuée dans ce modèle est que la phase liquide et la phase gazeuse sont toujours à l'équilibre thermodynamique à la température de condensation des gaz de sortie, soit 18 °C. Pour le calcul de cet équilibre, le milieu est assimilé à un mélange binaire d'eau et d'éthanol. En conséquence, l'équation d'équilibre thermodynamique est la suivante :

$$y_i = \gamma_i * x_i * \frac{P_0^i(t)}{P}$$

Où : y_i est la fraction molaire du constituant i dans la phase gazeuse

γ_i est le coefficient d'activité du constituant i

x_i est la fraction molaire du constituant i dans la phase liquide

P est la pression atmosphérique (760 mm Hg)

$P_0^i(t)$ est la pression de vapeur saturante du constituant i à la température t

Les coefficients d'activité sont calculés par un modèle classique de coefficient d'activité. Pour ce binaire, un modèle simple a été choisi, la loi de Margules :

$$\gamma_{\text{eth}} = \exp\left(\frac{A_{12}}{1+(A_{12} \cdot X_{\text{eth}}/(A_{21} \cdot (1-X_{\text{eth}})))}\right)$$

Où : γ_{eth} est le coefficient d'activité de l'éthanol

X_{eth} est la fraction molaire de l'éthanol dans la phase liquide

A_{12} et A_{21} sont les paramètres d'interactions binaires (1,7392) disponibles dans la littérature

Avec ce modèle, la concentration dans la phase gazeuse peut être calculée et, avec le débit de gaz connu pour chaque expérimentation, il est possible de déterminer la quantité d'éthanol évaporée. La quantité globale d'éthanol produite (éthanol dans la phase liquide + éthanol dans la phase gazeuse) peut ainsi être calculée pour chaque fermentation, même en présence d'évaporation importante.

Afin toutefois de valider ce modèle d'évaporation d'éthanol, des expériences ont été réalisées avec une solution contenant uniquement de l'éthanol à 90 g/L dans de l'eau, dans le réacteur NBS avec des aérations de 0,3 ; 0,6 et 1 VVM. Les concentrations d'éthanol dans la phase liquide ont été mesurées au cours du temps. Pendant 150 h, elles ont diminuées de 90 g/L à 55 g/L, 35 g/L et 18 g/L pour ces débits d'aération (cf Figure II-5).

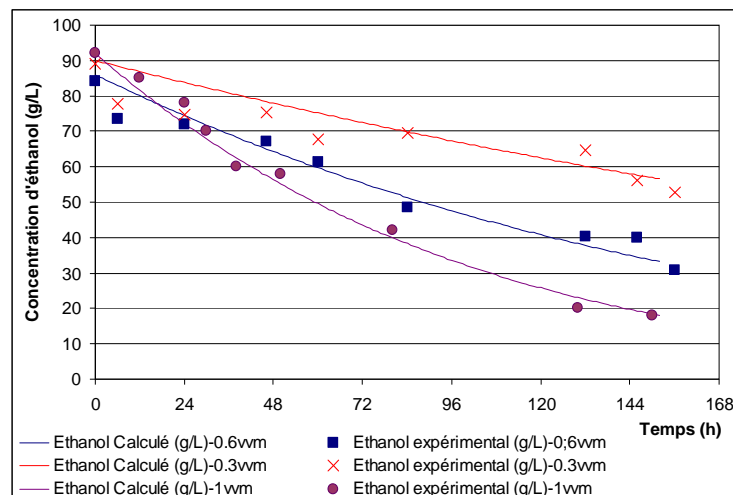


Figure II-5. Validation du modèle de calcul d'éthanol évaporé au cours des tests d'évaporation à 0,3 ; 0,6 et 1 vvm de solution (éthanol-eau, 90 g/l).

L'évaporation est la seule explication pour cette diminution. Les résultats pour l'évaporation obtenus par le modèle thermodynamique proposé sont également représentés sur la Figure II-5. Ils correspondent bien avec les données expérimentales. Ces expérimentations nous permettent de valider le modèle et de l'utiliser avec les mesures de la concentration d'éthanol dans la phase liquide pour déterminer la concentration globale de l'éthanol produite pendant les fermentations.

II-2-2-7-11 Déterminations de la composition de CO₂ et O₂ dans le gaz sortie du NBS

Deux analyseurs de gaz SERVOMEX connectés à la sortie des fermenteurs permettent d'établir l'évolution de la composition en O₂ et CO₂ des gaz. Le schéma général de l'installation du Bio-fermenteur (New Brunswick Scientific) est présenté sur la Figure II-6.

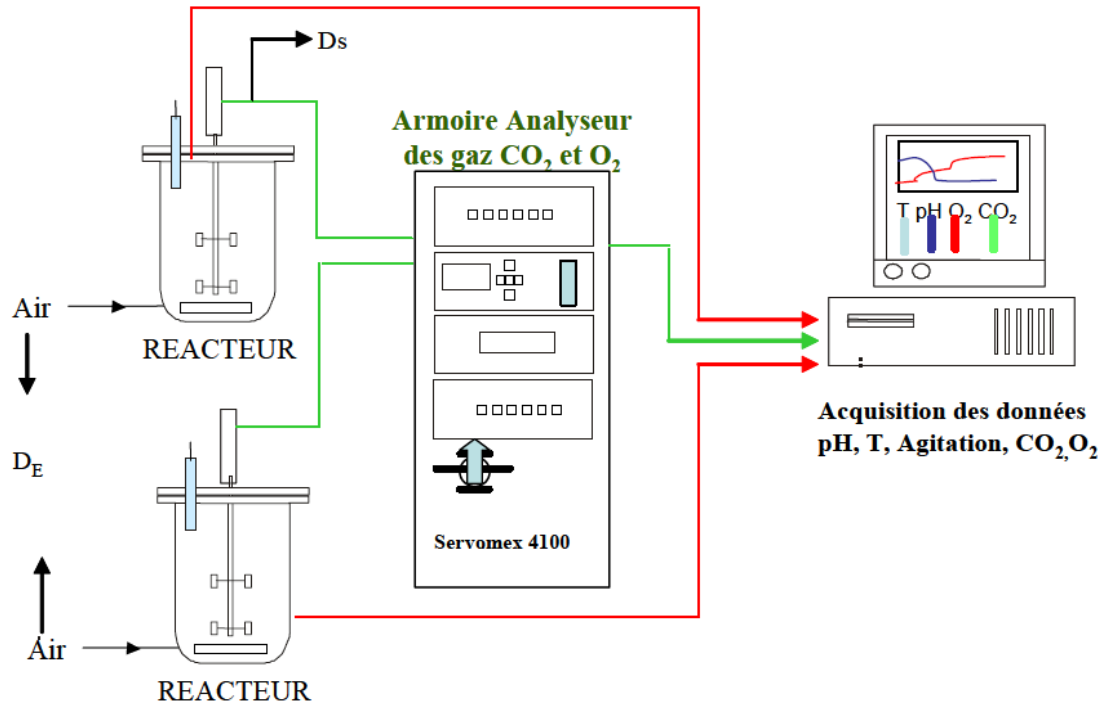


Figure II-6. Schéma général de l'installation du Bio-fermenteur

L'analyseur d'oxygène exploite les propriétés paramagnétiques du gaz alors que l'analyseur de CO₂ permet sa quantification grâce à l'absorption de radiations IR par la molécule. Ces appareils transmettent à l'ordinateur des tensions électriques proportionnelles à la composition du gaz en sortie du bio-fermenteur. Les appareils donnent la composition en pourcentage de CO₂ et d'O₂. L'analyse du gaz en sortie a été faite par la méthode des bilans gazeux qui repose sur la conservation du débit molaire en azote dans le courant gazeux traversant le fermenteur. En effet, le débit de gaz de sortie (D_S) du réacteur est déterminé par un bilan matière sur l'azote qui est un gaz inerte et donc non utilisé par les microorganismes et donc se retrouve intégralement dans le courant gazeux sortant du bio-fermenteur.

$$D_S * X_S^{N_2} = D_E * X_E^{N_2}$$

$$D_S = \frac{D_E * X_E^{N_2}}{X_S^{N_2}}$$

$$D_S = \frac{(D_E * X_E^{N_2})}{1 - (X_S^{O_2} + X_S^{CO_2} + X_S^{eth})}$$

Dont:

D_S : Débit de gaz en sortie en entrée du réacteur (L/h)

D_E : Débit de gaz (air) en entrée du réacteur (L/h)

Dont:

D_S : Débit de gaz en sortie en entrée du réacteur (L/h)

D_E : Débit de gaz (air) en entrée du réacteur (L/h)

$X_E^{N_2}$: Fraction molaire du diazote en entrée du réacteur (air)

$X_E^{O_2}$: Fraction molaire du dioxygène en entrée du réacteur (air)

$X_E^{CO_2}$: Fraction molaire du dioxyde de carbone en entrée du réacteur (air)

$X_S^{O_2}$: Fraction molaire du dioxygène en sortie du réacteur

$X_S^{CO_2}$: Fraction molaire du dioxyde de carbone en sortie du réacteur

X_S^{eth} : Fraction molaire de l'éthanol en sortie du réacteur, calculée par le modèle mathématique.

Le bilan complet entre l'entrée et la sortie du fermenteur conduit à l'expression générale de la vitesse de consommation en oxygène (r_{O_2}) et de la vitesse de production de dioxyde de carbone (r_{CO_2}).

$$r_{O_2} = \frac{(D_E * X_E^{O_2}) - (D_S * X_S^{O_2})}{VM}$$

$$r_{CO_2} = \frac{(D_S * X_S^{CO_2}) - (D_E * X_E^{CO_2})}{VM}$$

avec :

r_{O_2} : Vitesse de consommation de l'oxygène (mol/h)

r_{CO_2} : Vitesse de production de dioxyde de carbone (mol/h)

VM : le volume molaire d'un gaz parfait à 20 °C et 1 bar (24,534 L/mol)

En conséquence, les quantités cumulées d'oxygène consommé et de dioxyde de carbone produit sont calculées par intégration des vitesses après lissage par polynôme de degré 3 ou 4.

II-2-3 Lissage des données expérimentales

Les données expérimentales pour les cinétiques des FA ont été lissées avec une fonction spline cubique (Reinsch, 1967). Cette fonction $g(T)$ vérifie pour chaque couple de points expérimentaux (T_i, X_i) les conditions :

$$\int_{T_o}^{T_n} g''(T)^2 dT, \text{ minimum} \quad \text{et} \quad \sum_{i=0}^{i=n} \left(\frac{g(T_i) - X_i}{\sigma(X_i)} \right)^2 < S$$

Avec,

X_i : valeur expérimentale de la variable X au temps T

T_i : Temps de prise de l'échantillon, compté à partir de l'ensemencement

$\sigma(X_i)$: écart-type lié aux valeurs expérimentales de X

n : nombre total de points expérimentaux

S : constante de lissage

La première condition vise à minimiser $g''(T)$, la dérivée seconde des fonctions de lissage $g(T)$. Ceci rend linéaire les jonctions des courbures les unes entre les autres, générant ainsi des fonctions lisses. La deuxième condition exerce une contrainte sur ce lissage. En effet, la somme des carrés des écarts entre les points expérimentaux et les points du lissage ne doit pas dépasser la constante 'S'.

Le programme permet à l'utilisateur de choisir la constante de lissage. En pratique, elle doit être choisie conformément aux règles suivantes :

- L'allure de la courbe dérivée $g'(T)$ doit être physiquement significative.
- La courbe $g(T)$ ne doit pas dépasser graphiquement les barres d'erreur sur les points expérimentaux.

Nous avons créé une macro d'Excel qui permet aux utilisateurs de choisir manuellement la constante S et d'examiner son impact sur les courbes en temps réels.

II-2-4 Calcul des erreurs expérimentales

Si m mesures x_i d'une grandeur X sont effectuées, la valeur vraie de X peut être estimée par la moyenne \bar{x} des m valeurs x_i définie par : $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m x_i}{m}$

L'estimation est d'autant meilleure que la dispersion des valeurs x_i autour de \bar{x} est étroite (cf Figure II-7) La dispersion des valeurs x_i peut être caractérisée par le coefficient de variation Vr : $Vr = \frac{\sigma_x}{\bar{x}}$

σ_x est l'écart type de X. L'écart type est la racine de la variation σ_x^2 définie par :

$$\sigma_x^2 = \lim_{m \rightarrow \infty} \frac{\sum_{i=1}^m (x_i - x_0)^2}{m}$$

La valeur σ_x est égale inconnue. Une estimation est alors effectuée à partir de m valeurs

de x_i et notée s_x :

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}{m-1}}$$

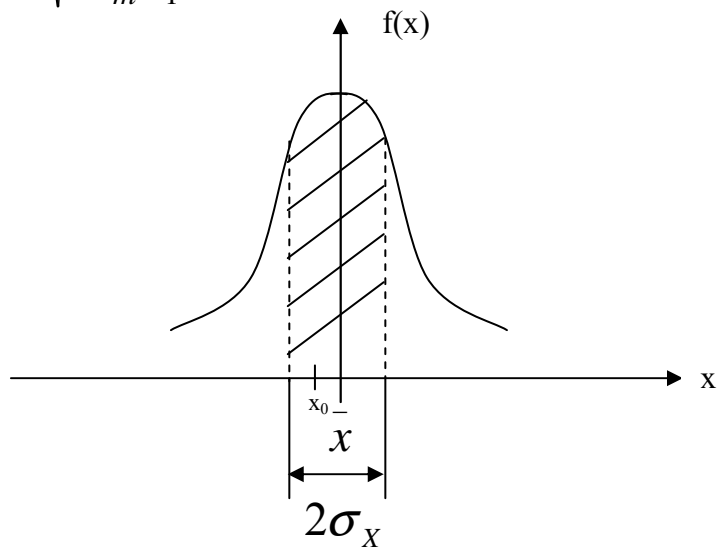


Figure II-7. Comparaison de la valeur estimée \bar{x} à partir de m valeurs mesurées et de la valeur vraie x_0

Le coefficient de variation (couramment appelé erreur expérimentale) traduit la répétabilité de la méthode et s'écrit alors : $Vr = \frac{s_x}{\bar{x}}$

II-2-5 Paramètres cinétiques utilisés pour l'analyse des résultats des FA

La durée de la FA (h) est le temps pour que 97 % du sucre initial soit consommé.

Le rendement en éthanol

Y_p (g/g) est défini comme étant le rapport de la quantité d'éthanol formée sur la quantité de sucre consommée, exprimé en g/g :
$$Y_p(g/g) = \frac{E - E_0}{S_0 - S}$$

Vitesse moyenne de production d'éthanol (ou productivité d'éthanol)

P_p (g/L/h) est définie comme étant le rapport de la quantité d'éthanol formée sur la durée de FA, exprimé en g/L/h :
$$P_p(g/L/h) = \frac{E - E_0}{t - t_0}$$

La vitesse moyenne de consommation du sucre

R_s (g/L/h) est définie comme étant la quantité totale de sucre consommée divisée par la durée de la FA. Elle est exprimée en g/L/h :
$$R_s(g/L/h) = \frac{S_0 - S}{t - t_0}$$

Le rendement de biomasse

Y_x (g/g) est définie comme étant le rapport de la quantité de biomasse formée sur la quantité de sucre consommée, exprimé en g/g :
$$Y_x(g/g) = \frac{X - X_0}{S - S_0}$$

La vitesse spécifique de la croissance

μ (h^{-1}) est la dérivé de la biomasse en fonction du temps divisée par la quantité de biomasse donc ramenée à la cellule :
$$\mu = \frac{dX}{X \cdot dt}$$

La vitesse spécifique de la consommation du sucre

q_s est exprimé par (g sucre / g biomasse /h) est la dérivé du sucre en fonction du temps divisée par la quantité de biomasse donc ramenée à la cellule :
$$q_s(g/g/h) = \frac{dS}{X \cdot dt}$$

CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III-1 EFFET DE L'OXYGENE SUR LE METABOLISME DE *TORULASPORA DELBRUECKII*

L'analyse bibliographique a mis en évidence certaines contradictions concernant l'effet de l'oxygène sur les levures *Torulaspora delbrueckii*. Suivant les souches de *Torulaspora* utilisées et les conditions d'études (milieux de cultures notamment), cette levure est tantôt décrite comme grosse consommatrice d'oxygène pour sa croissance, avec des besoins bien supérieurs à ceux de *Saccharomyces*, tantôt comme ne nécessitant pas des besoins en oxygène plus élevés que ceux de *Saccharomyces*. Afin d'éclaircir ce point pour la souche choisie et les conditions utilisées pour notre étude, nous présenterons dans ce premier chapitre de la partie résultats les expériences et conclusions obtenues lors de l'aération par 4 débits d'air différents de la fermentation de *Torulaspora* sur le milieu MS300 décrit précédemment. Cette partie est présentée sous forme d'article.

Résumé

Afin de déterminer l'effet de l'oxygénation sur le métabolisme de *Torulaspora delbrueckii*, des fermentations ont été menées sur un milieu synthétique simulant le jus de raisins blancs dans différentes conditions d'aération : anaérobie et 3 débits d'air différents. Les bilans de carbone et d'azote ont été réalisés et ont permis de quantifier la répartition des flux métaboliques dans la cellule. L'augmentation des apports d'oxygène a favorisé la voie métabolique de la croissance au détriment de la voie fermentaire. En anaérobiose une grande quantité de glycérol a été produite (13,4 g/l) afin de maintenir la balance redox de la cellule. Les capacités de consommation de l'oxygène se sont révélées très importantes pour cette souche puisque même pour le plus fort débit (923 mmol O₂/L/h) l'oxygène est devenu limitant après 24h de fermentation. Toutefois, cette souche a été capable de bien se développer en absence d'oxygène puisqu'elle a consommé 220 g/l de sucre (glucose/fructose) en 166 h à 20°C avec un bon rendement en ethanol (0,471g /g).

The effect of oxygen on the alcoholic fermentation of *Torulaspora delbrueckii*

Cédric Brandam¹, Quoc Phong Lai¹, Anne Julien-Ortiz² and Patricia Taillandier^{1*}

¹Université de Toulouse, INP-ENSIACET, Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503, 4, allée Emile Monso – BP 84234 – 31030 Toulouse, FRANCE

²Lallemand S.A.S., 19, rue des Briquetiers BP59 31702, Blagnac Cedex, FRANCE

* Corresponding author: Tel: +33532333618; Fax: +33534323398

E-mail address: patricia.taillandier@ensiacet.fr

Abstract

Torulaspora delbrueckii growth and fermentation kinetics were assessed in a synthetic culture medium similar to grape must in different conditions: anaerobia and 3 different oxygen feedings in order to determine the effect of oxygen on the metabolism. Carbon and nitrogen mass balances were realized to quantify metabolic fluxes. The effect of oxygen was to decrease the fermentative pathway in favour of growth. In anaerobia high amount of glycerol (13.4 g.L⁻¹) were produced to maintain the redox balance. Oxygen requirement of this strain was high since even for the highest air feeding the oxygen became limiting after 24 hours. Nevertheless this strain was able to well develop in absence of oxygen and to consume 220 g.L⁻¹ of sugars (glucose/fructose) in 166 h at 20°C giving a good yield in ethanol (0.471 g.g⁻¹).

Key words: *Torulaspora delbrueckii*, oxygen effect, wine fermentations, Carbon fluxes, kinetic analysis.

III-1-1 Introduction

In the wine-making process, the step of alcoholic fermentation (AF) is essential for the wine final quality. The choice of the yeast strain which transform sugars into ethanol is especially determinant. Traditionally, yeasts belonging to the *Saccharomyces* genus are used. However, in enology an increasing number of studies dealing with non-*Saccharomyces* yeasts reflects an actual interest for these microorganisms [6, 10, 13]. Among the non-*Saccharomyces*, the most studied yeasts are *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Kloeckera*, and *Torulaspora* [16, 18, 19, 26]. In most of the cases, these non-*Saccharomyces* yeasts are used in addition to the traditional *Saccharomyces* yeasts. The objective is to associate the fermentative efficacy of *Saccharomyces* with the specificities of the non-*Saccharomyces*, in particular for the production of typical aroma and the development of specific organoleptical qualities. Among these non-*Saccharomyces*, it was demonstrated that *Torulaspora* yeasts are notably producer of positive volatile compounds, such as the butanoate, hexanoate, octanoate and ethyle decanoate [4, 5, 11]. It was also shown that *T. delbrueckii* strains produced less negative aroma compounds, like acetaldehyde and acetoin [6, 24]. Therefore, *T. delbrueckii* is generally considered as a yeast strain giving fruity notes to wines [10].

However, due to the competition with *S. cerevisiae* strains and other indigenous yeasts, the inoculated *T. delbrueckii* may have difficulties to grow significantly in winemaking conditions. Several studies showed the early death of this yeast when it is inoculated in mixed culture with *Saccharomyces* [6, 12]. Several explanations can be proposed: inhibition by the ethanol, important requirement in oxygen for this strain or competition to the substrates. Before determining the best conditions to use *T. delbrueckii* in wine-making, it seems important to determine its behaviour in the pure culture in controlled conditions. Therefore, many points should be clarified as: the real influence of the oxygenation during the AF in winemaking on *T. delbrueckii* metabolism, the influence on kinetics of *T. delbrueckii* fermentation and its comparison with *S. cerevisiae* strains.

Previous studies on the oxygen requirements were made under conditions quite far from the real AF conditions in winemaking. Alves-Araujo et al [2] showed that the oxygen requirement of *T. delbrueckii* was more important than the one of *S. cerevisiae*. However, this observation has been made in bread fermentation with a *T. delbrueckii* strain isolated from wheat. Hanl et al [9] showed that the oxygen feeding had a capital importance on the metabolism of *T. delbrueckii*, but once again, the conditions were different from the traditional AF in winemaking, since it was a chemostat culture in the YPD medium at 30 g/L. In some cases, it has been reported that *T. delbrueckii* was unable to grow under anaerobic conditions [14, 25]. Among the studies, this yeast was either classified as a Crabtree positive [2, 15] or Crabtree negative specie [21].

It can be seen from the literature data that *T. delbrueckii* requires high amount of oxygen for its development but few of these studies were realized in conditions close to grape must fermentation (high sugars concentrations, low pH).

Thus, the objective of this study was to quantify the influence of oxygenation on the metabolism and fermentation kinetics of a *T. delbrueckii* strain selected for wine-making. This study was carried out in batch fermentations of synthetic grape must. The studied aeration feed rates were voluntary larger than the oxygen quantities classically encountered in winemaking to accentuate phenomena and well understand the effect of this parameter on *T. delbrueckii* metabolism.

III-1-2 Materials and Methods

Microorganisms

The used microorganism was *Torulaspora delbrueckii* NSC123, supplied by the company LALLEMAND Inc. Montréal, Canada.

Fermentation media

Fermentations were carried out on synthetic media defined by Salmon et al [23]: glucose (115 g.L⁻¹), fructose (115 g.L⁻¹), malic acid (6 g.L⁻¹), citric acid (6 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0.75 g.L⁻¹), K₂SO₄ (0.5 g.L⁻¹), MgSO₄ 7 H₂O (0.25 g.L⁻¹), CaCl₂ 2H₂O (0.16 g.L⁻¹), NaCl (0.2 g.L⁻¹), NH₄Cl (0.46g.L⁻¹), 1 mL.L⁻¹ of anaerobia factors stock solution, 1 mL.L⁻¹ of oligo-elements stock solution, 13.04 mL.L⁻¹ of amino acids stock solution and 10 mL.L⁻¹ of vitamins stock solution. The compositions of these 4 stocks solutions were as followed:

- solution of oligoelements (g/L): MnSO₄.H₂O 4, ZnSO₄.7H₂O 4, CuSO₄.5H₂O 1, KI 1, CoCl₂.6 H₂O 0.4, H₃BO₃ 1, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 1

- solution of amino acids (g/L): Tyrosine 1.4, tryptophan 13.7, isoleucine 2.5, aspartic acid 3.4, glutamic acid 9.2, arginine 28.6, leucine 3.7, threonine 5.8, glycine 1.4, glutamine 38.6, alanine 11.1, valine 3.4, methionine 2.4, phenylalanine 2.9, serine 6.0, histidine 2.5, lysine 1.3, cysteine 1.0, proline 46.8

- solution of vitamins (g/L): Myo-Inositol 2, Calcium pantothenate 0.15, hydrochloride thiamin 0.025, nicotinic acid 0.2, pyridoxine 0.025, biotin 3 ml

- solution of anaerobic factors (g/100mL): ergosterol 1.5, Oleic acid 0.5 mL, Tween 80 50 mL, absolute ethanol 50mL.

The nitrogen sources were ammonium ions brought by NH₄Cl for an equivalent of 120 mgN.L⁻¹ and amino acids at the exception of proline for an equivalent of 204 mgN.L⁻¹. The pH of the medium was adjusted to 3.3 before autoclaving with a sodium hydroxide solution (8N).

Fermentation experiments

Fermentations were carried out in duplicate in New Brunswick Scientific (NBS) reactor containing 1.8 L of culture medium under a 250 rpm agitation. Temperature was regulated at 20°C. The pH was not controlled during fermentations. For all fermentations, the initial yeast concentration at inoculation was 10 millions of viable cell/ml of *T. delbrueckii*. Samples of 20 mL were regularly withdrawn and centrifuged at 10000 rpm in 10 minutes at 4°C. The obtained supernatants were stored at -20°C for the further analysis.

In order to determine the effect of oxygen on the AF of *T. delbrueckii* NSC123, oxygen supplies for the fermentations were regulated by massic flowmeters at 4 different conditions such as 0 mL.min⁻¹, 540 mL.min⁻¹, 1080 mL.min⁻¹ and 1800 mL.min⁻¹ of air. This aeration flow will be called 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM (volume of air by medium volume and by minutes) respectively. The values of K_{LA} have been determined for the three aeration rates to 8.0, 13.1 and 19.9 h⁻¹ for 0.3, 0.6 and 1 VVM, respectively.

Compounds concentrations measurements

Glucose was analyzed by enzymatic method realized automatically with Yellow Spring Instrument 2700 with an experimental error of 3%. The total sugar amounts were determined by using of dinitrosalysilic reagent described by Miller [17] with an experimental error of 4%. Concentrations of ammonium, L-alpha amino acid nitrogen, L-malic acid, L-lactic acid and acetic acid were analyzed by specific enzymatic methods (kits MicroDOM) with an experimental error of 2.5%. The ethanol and glycerol concentrations were measured by HPLC method with an experimental error of 5%. The apparatus (TSP Spectra System) has a specific column (Biorad Aminex HXP-87H) to separate alcohols, organic acids and sugars. The liquid phase consists of a 5mM sulphuric acid solution circulating at 0.4 mL.min⁻¹. The temperature of the column was set to 40°C and the volume of the loop of injection was 20 µL. The detection of each component is done using a differential refractometer (TSP RefractoMonitor V).

Dissolved oxygen concentrations in the medium were measured by a probe of oxy-meter. Percentages of O₂, CO₂ exhaust gas were determined by a gas analyzer (Servomex 4100, paramagnetic transducer for O₂ and infrared transducer for CO₂).

Yeast population was followed by optical density (OD) of yeast suspension at 620nm. From specific experiment data, a linearly correlation (for OD < 0.8) between the dried weight of biomass measured by thermo-balance using infrared rays with an experimental error of 5.5% and the optical density OD_{620nm} was determined:

$$X_{\text{biomass}} = 1.1353 \times \text{OD}_{620\text{nm}} \quad (R^2 = 0.9613)$$

X_{biomass} is the dried weight of biomass in g.L⁻¹.

The elemental composition of the biomass has been measured with the CHNS/O AE1110 and Flash-EA1112 analyzer (Thermofinnigan). The principle was to analyse by chromatography

the gases produced by the combustion in oxygen at 1800°C of a solid biomass sample. The analyzer gives the composition in C, H, O, N and S with an experimental error of 4.6%.

Data smoothing

Experimental data for the kinetic of the fermentations were smoothed with a cubic spline function. The following conditions for the spline function $g(t)$ must be verified for every couple of experimental points $(t_i ; x_i)$:

$$\int_{t_0}^m g''(t)^2 dt \text{ minimum and } \sum_{i=0}^{i=n} \left(\frac{g(t_i) - x_i}{\sigma(x_i)} \right)^2 \langle S$$

x_i : experimental value x at time t_i

$\sigma(x_i)$: standard deviation of the experimental values of x

S : smoothing constant

Mathematical model to calculate ethanol evaporation

Fermentations realized with air flow of 0.3 VVM, 0.6 VVM and 1 VVM induced a significant evaporation during time. Thus, from 1.8 L of medium at the initial time, liquid volumes were only of 1.8, 1.75, 1.7 and 1.65 L at the final time for fermentations at 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM respectively. This evaporated volume was composed of volatile compounds of medium. We suppose that water and ethanol constituted the majority of these compounds. Other volatile compounds were certainly also presents in the evaporated volume but their relative little quantities are supposed negligible compared to these two major compounds. Yet, to exploit the data it is necessary to have ethanol concentration in liquid but equally to have ethanol concentration in gas. In gas, ethanol was not measured but calculated with a mathematical model. The hypothesis made in this model was that liquid medium and gas phase was always in thermodynamic equilibrium at the temperature of the condenser present on the exit gases (18°C). For the equilibrium calculation, medium is assimilated to a binary mixture of water and ethanol. So, the equilibrium equation is:

$$y_{eth} = \gamma_{eth} * x_{eth} * \frac{P_{eth}^0(T)}{P}$$

Where:

Y_{eth} is the molar fraction of ethanol in the gas phase.

γ_{eth} is the activity coefficient of ethanol.

x_{eth} is the molar fraction of ethanol in the liquid phase.

P is the atmospheric press (760mm Hg)

$P_{eth}^0(T)$ is the pressure of saturated vapour of ethanol at temperature T .

The activity coefficient of ethanol (γ_{eth}) is calculated by a model of activity coefficient. For this classical binary, a simple model as the law of Margules can be used:

$$\gamma_{eth} = \exp\left[\frac{A_{12}}{1 + \frac{A_{12}x_{eth}}{A_{21}(1-x_{eth})}}\right]$$

Where:

A_{12} and A_{21} are binary interaction parameters ($A_{12} = 1.7392$ and $A_{21} = 0.9253$)

With this model, ethanol concentration in gas phase can be calculated and with the known flow of gas for each experiment, it is possible to determine the evaporated quantity of ethanol and to rebuild the global quantity of ethanol produced (ethanol in liquid phase + ethanol in gas phase). In order to validate this ethanol evaporation model, experiments were realized with only water - ethanol solutions of 90 g.L⁻¹ in NBS reactor, with aeration of 0.3, 0.6 and 1 VVM. Ethanol concentrations in liquid phase were measured during time. In 150 h, they decreased from 90 g.L⁻¹ to 55 g.L⁻¹, 35 g.L⁻¹ and 18 g.L⁻¹ for the three air flows. The evaporation is the only explication for this decrease. Results given by the thermodynamic model fit very well with experimental data. So these experiments allowed us to valid the model and to use it with the measure of ethanol concentration in liquid phase for determining the global ethanol concentration produced during fermentations.

Calculation of cumulated values for CO₂ production and O₂ consumption

CO₂ and O₂ withdraw of the AF were real-time analyzed and recorded by an automatically gas analyzer (CO₂/O₂), connected with the NBS reactor. These data are treated to calculate the accumulated values of CO₂ production and O₂ consumption by *T. delbrueckii*.

$$r_{o_2} = \frac{(D_E * X_E^{O_2}) - (D_S * X_S^{O_2})}{VM}$$

$$r_{co_2} = \frac{(D_S * X_S^{CO_2}) - (D_E * X_E^{CO_2})}{VM}$$

$$\text{With } D_S = \frac{(D_E * X_E^{N_2})}{1 - (X_S^{O_2} + X_S^{CO_2} + X_S^{eth})}$$

Where:

r_{o_2} is the rate of oxygen consumption (mol.L⁻¹)

r_{co_2} is the rate of CO₂ production (mol.L⁻¹)

D_E is the inlet gas rate of the reactor (L.h⁻¹)

D_S is the outlet gas rate of the reactor (L.h⁻¹)

$X_E^{N_2}$ is molar fraction of N₂ inlet of the reactor (air).

$X_E^{O_2}$ is molar fraction of O₂ inlet of the reactor.

$X_E^{CO_2}$ is molar fraction of CO₂ inlet of the reactor.

$X_S^{O_2}$ is molar fraction of O₂ outlet of the reactor.

$X_S^{CO_2}$ is molar fraction of CO₂ inlet of the reactor.

X_S^{eth} is molar fraction of ethanol outlet of the reactor and calculated with the mathematical model

VM is molar volume of perfect gas at 20°C and 1 bar (24.534 L.mol⁻¹).

The accumulated quantities of consumed O₂ and produced CO₂ were calculated by the integration in time of the rates.

III-1-3 Results and discussions

Influence of the aeration on the repartition of the carbon flux

During the 4 experiments with the different aeration flows, the atomic composition in C, H, O, N of the *T. delbrueckii* dried biomass was analyzed. Table III-1-1 presents the mass composition of the final biomass, as well as the initial biomass for these 4 experiments.

Table III-1-1. Elemental composition of the T. delbrueckii dried biomass at the end of the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM (%w/w).

Initial biomass	38.8	44.2	4.6	7.0	94.6
Aeration	Oxygen (%)	Carbon (%)	Nitrogen (%)	Hydrogen (%)	Total (%)
1.0 VVM	40.1	44.2	3.0	6.9	94.1
0.6 VVM	39.8	43.7	3.1	6.9	93.4
0.3 VVM	40.4	45.3	3.3	7.2	96.2
0 VVM	37.8	43.3	6.5	6.7	94.3

We observe that this composition varies depending on the aeration conditions. For the AF in the absence of aeration (0 VVM), the nitrogen fraction is higher at the expense of the fraction of oxygen. The nitrogen concentration is 6.5 % and the oxygen one is 37 % for this AF, and about 3 % and 40 %, respectively in the other 3 experiments. The composition of initial biomass in nitrogen and oxygen is intermediate between the non-aerated cultures and the aerated ones.

Main compounds concentrations (substrates and products) were measured at the beginning and the end of the AF and consumed oxygen and produced carbon dioxide were determined as explained previously (table III-1-2). Taking into account the percentage of carbon in the chemical composition of these components and correcting by the variation of the volume due to the evaporation during AF, it is possible to establish the carbon balance and to determine the distribution of the fluxes under different aeration conditions.

Table III-1-2. Final concentrations of major components in 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.

	0 VVM	0.3 VVM	0.6 VVM	1 VVM
Biomass (g.L ⁻¹)	4.4	8.9	10.0	11.8
Residual sugar (g.L ⁻¹)	12.3	10.5	11.8	11.2
Ethanol (g.L ⁻¹)	104.6	101.0	98.1	99.9
Cumulated produced CO ₂ (g.L ⁻¹)	99.0	108.9	117.3	129.3
Cumulated consumed oxygen (g.L ⁻¹)	0.0	9.2	16.3	24.1
Glycerol (g.L ⁻¹)	13.4	6.3	2.2	2.5
Acetate (g.L ⁻¹)	0.3	0.2	0.1	0.3
Malic acid (g.L ⁻¹)	4.9	3.4	2.4	2.5
Citric acid (g.L ⁻¹)	6.0	6.0	6.0	6.0
Lactic acid (g.L ⁻¹)	0.1	0.1	0.1	0.1
Succinic acid (g.L ⁻¹)	0.3	1.7	1.7	0.4
NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0
N α (mg.L ⁻¹)	19.5	11.5	10.5	12.2

The criterion for the end of AF was chosen as the time at which 95 % of initial sugars were consumed, which corresponds to about 11g.L⁻¹ of residual sugars. For all fermentations, the residual sugars were exclusively composed of fructose, while glucose was exhausted earlier in the AF.

Firstly, the results of carbon balance show that the conservation of C is maintained between the beginning and the end of AF since the difference between the initial and the final carbon fluxes is 0.2 %, 0.2 %, 0.1 % and 2.7 %, respectively for the fermentations at 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM. These percentages are very low given the experimental errors on sampling and measurements. This result shows good consistency of the experimental values. Also, it confirms that no other major constituent is produced during AF. These experimental values are therefore a solid basis for going further in interpretation of results.

The ethanol production during these 4 fermentations at 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM, was very close, whatever the aeration level: 98.1 to 104.6 g.L⁻¹. However, the trend was to decrease the

production of ethanol with increasing aeration. Ethanol yields from consumed sugars are thus decreasing with the increase of aeration rates: from 0.471 to 0.447 g.g⁻¹ (Table III-1-3).

Table III-1-3. Ethanol yield, consumed oxygen and produced CO₂ during the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.

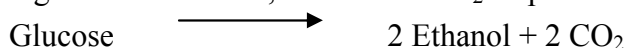
	0 VVM	0.3 VVM	0.6 VVM	1 VVM
Yield of ethanol/sugar (g.g ⁻¹)	0.471	0.457	0.448	0.448
CO ₂ produced by AF way (mol)	2.27	2.19	2.13	2.17
CO ₂ produced by others ways (mol)	0.00	0.28	0.53	0.77
consumed O ₂ (mol)	0.00	0.29	0.51	0.75
Ratio (CO ₂ produced by others ways/ O ₂ consumed)	ND	0.97	1.04	1.02

The amounts of produced biomass were also dependent on aeration level. Higher aeration rate increased the final biomass concentration from 4.4 g.L⁻¹ at 0 VVM to 11.8 g.L⁻¹ at 1 VVM. Similarly, oxygen consumption and carbon dioxide production followed the same trend from 0 g.L⁻¹ to 24.1 g.L⁻¹ of oxygen consumed and 99.0 to 129.3 g.L⁻¹ of CO₂ produced by AF for 0 to 1 VVM.

As far as glycerol production was concerned, the trend was inversed compared to the biomass production. It is produced in greater quantities when the AF is not aerated: 13.4 g.L⁻¹ at 0 VVM and 2.5 g.L⁻¹ at 1 VVM.

For the measured organic acids, few significant differences were observed for the production of the lactic acid, acetic acid and succinic acid. Citric acid was neither consumed nor produced whatever the aeration level. On the opposite, malic acid was consumed at an higher extent when the aeration was more important: 3.5 g.L⁻¹ at 1 VVM, and only 1.1 g.L⁻¹ at 0 VVM.

According the AF reaction, 1 mole of CO₂ is produced for each mole of produced ethanol:



Assuming that all of the produced ethanol comes from this reaction, it is then possible to calculate the quantity of produced CO₂ by this reaction. The difference between the measured CO₂ and the calculated one corresponds thus to the produced CO₂ by other metabolic pathways. The obtained values are presented in the table 3. They correspond almost exactly to the quantities of the consumed oxygen. The relation between the CO₂ produced by other metabolic pathways and the consumed oxygen varies here within 0.96 and 1.01, thus close to

1. This is consistent with what is usually described for the respiratory metabolism of yeasts leading to a ratio of CO₂ produced (by microbial growth) on consumed O₂ (Respiratory Quotient) close to 1.

Another metabolic pathway for consumed sugar in the AF is the production of glycerol.

It is therefore possible to calculate the proportion of carbon consumption that goes into each of the pathways:

- Fermentation: carbon of the produced ethanol plus carbon of produced CO₂ by the AF
- Glycerol: carbon of produced glycerol
- Respiration: carbon of produced biomass plus carbon of produced CO₂ excepting the AF.

The carbon of other minor compounds was here negligible. The figure III-1-1 recapitulates, for the 4 conditions of aerations, the repartition of carbon consumption between these 3 pathways. Then, the effect of the oxygen appeared clearly. The part of the AF decreased from 92 % to 84 %, of glycerol from 6 % to 1 %, respectively for the aerations at 0 VVM and 1 VVM.

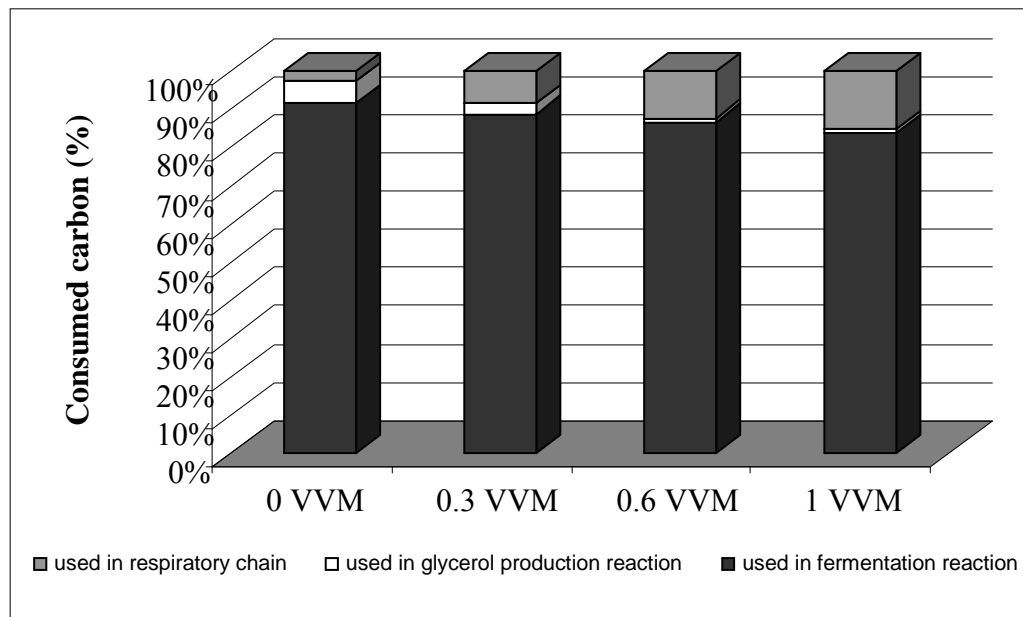


Figure III-1-1. Repartition of consumed carbon flux between the metabolic pathways of AF, production of glycerol and respiration for 4 conditions of aerations

Influence of the aeration level on nitrogen balance

In the same manner than for carbon balance, with the measurement of the ammonium, assimilable alpha-amino nitrogen and using the biomass chemical composition in nitrogen, it was possible to establish the nitrogen balance. These measurements allow us to evaluate the global quantity of nitrogen compounds at the beginning and at the end of the AF. The

obtained percentages of difference are also small enough: 0.7, 3.2, 1.5 and 9.7 %. That allows us to assure the coherence of our experimental results and to validate that nitrogen was not present in major constituents other than biomass.

For the 4 fermentations, the consumed nitrogen quantity is almost identical. The ammonium was totally exhausted and only 10 mg.L⁻¹ to 20 mg.L⁻¹ of assimilable nitrogen remained at the end of the AF. All of the consumed nitrogen can be found in the biomass of *T. delbrueckii*. It is interesting to note that such a nitrogen quantity is consumed to form different quantities of biomass (4.4 g.L⁻¹ to 10.8 g.L⁻¹). In fact, this difference led to a different proportion of nitrogen the chemical formula of the *T. delbrueckii* dried biomass at the end of the AF (Table 1).

Influence of the aeration on the fermentation kinetics

For the 4 fermentations, the value of dissolved oxygen in the liquid medium was equal to zero as early as 24 h of AF. With the measurement of the oxygen content in the gas phase, we can therefore establish the oxygen consumption rate during the AF. We obtain for the 3 aerated fermentations the linear consumptions in the course of time (data not shown). In fact, whatever the aeration level was, all of the transferred oxygen from the gas phase to the liquid one was immediately consumed by the yeast cells. The rate of oxygen consumption corresponds here to that of oxygen transfer from the gas phase to the liquid one which is governed by the following equation:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = KLa.(O_2^* - O_2)$$

O₂: dissolved oxygen concentration in the medium (mg.L⁻¹).

O₂^{*}: saturated dissolved oxygen concentration in the medium (8.8 mg.L⁻¹ at 20°C in water).

As the oxygen concentration in the liquid phase is zero after 24 h of the AF, this equation

becomes:
$$\frac{d[O_2]}{dt} = KLa.(O_2^*)$$

It corresponds well to a constant rate and then a linear evolution of cumulated oxygen consumption. Then, these consumptions are not reflecting of the oxygen requirement of *T. delbrueckii*, but represent the oxygen transfer rate in the medium. For the three aerations, transfer rates were 70, 115 and 175 mg O₂.L⁻¹.h⁻¹, respectively for 0.3, 0.6 and 1VVM. We can only conclude that *T. delbrueckii* has a maximal oxygen consumption rate higher than the oxygen transfer rate in the medium, thus superior to 175 mg O₂.L⁻¹.h⁻¹. At the moment where oxygen became limiting in the media, biomass concentration was 4 g.L⁻¹. So, specific oxygen consumption rate was 1.36 mmol O₂.g⁻¹.h⁻¹. Nevertheless, the oxygen effect on the fermentation kinetics could be observed. The table 4 presents that the AF durations calculated when 95 % of initial sugar have been consumed. For 4 aeration rates at 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM are 166 h, 132 h, 142 h and 137 h, respectively. The 3 aerated fermentations have AF

durations around 137 h more or less 5h whereas the non aerated AF has a duration significantly longer of about 30 h.

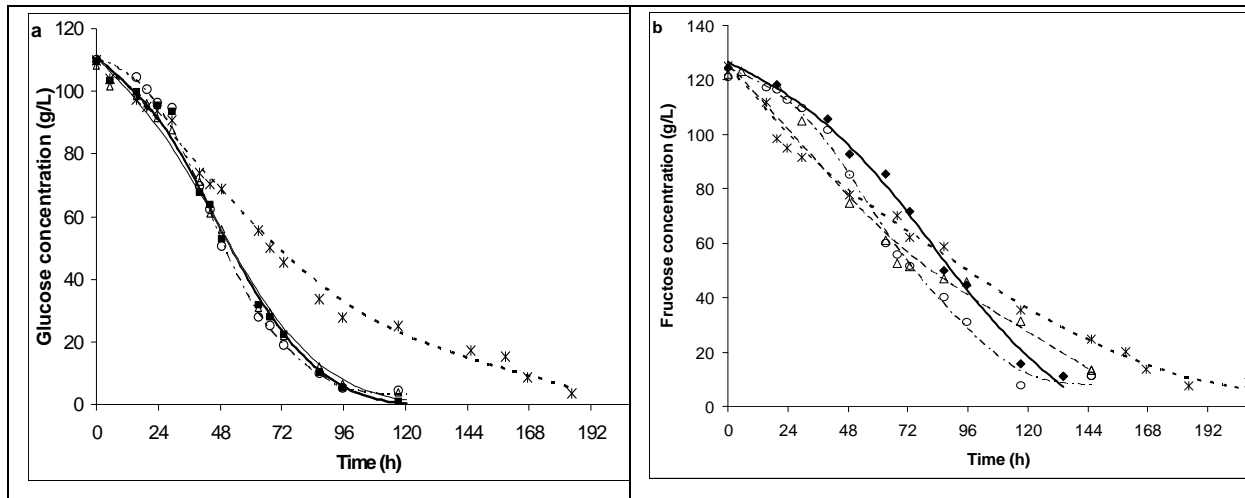


Figure III-1-2. Consumption of glucose (a) and of fructose (b) during the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.

In a similar manner little differences in the glucose consumption rates between the aerated fermentations were observed, but this consumption rate was slower for the non-aerated one (Fig. III-1-2a). On the opposite, for fructose, whatever the aeration level was, kinetics of fructose consumption were similar (Fig. III-1-2b). It can be noted that this *T. delbrueckii* strain was more glucophilic when the medium was aerated. In anaerobiosis, glucose and fructose were consumed at the same rate and after 166 h, it remained equal concentration of glucose and fructose (5 g/L for each of the sugars). The calculation of the mean sugar consumption rates confirms this phenomenon: 1.1 g of consumed glucose.L⁻¹.h⁻¹ and 0.85 g of consumed fructose.L⁻¹.h⁻¹ for the aerated fermentations, 0.63 and 0.7 g.L⁻¹.h⁻¹, respectively for the non-aerated AF (Table III-1-4).

Table III-1-4. Average rate of glucose and fructose consumption and duration of the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.

	0 VVM	0.3 VVM	0.6 VVM	1 VVM
Time (h)	166	132	142	137
Average glucose consumption rate (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0.63	1.09	1.10	1.15
Average fructose consumption rate (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0.70	0.89	0.81	0.86

The Figure III-1-3 illustrates the kinetics of growth in the 4 fermentations. Again, for the 3 aerated fermentations growth was similar, whereas for the non-aerated one growth was decreased. Using growth kinetics and sugar consumption kinetics, it is possible to determine the specific rate of sugar consumption (Fig. III-1-4). Therefore, it seems that the specific rate is more rapid in the case of non-aerated AF than that of the aerated ones. Thus, under aeration, more biomass was formed, but each cell consumed less sugars.

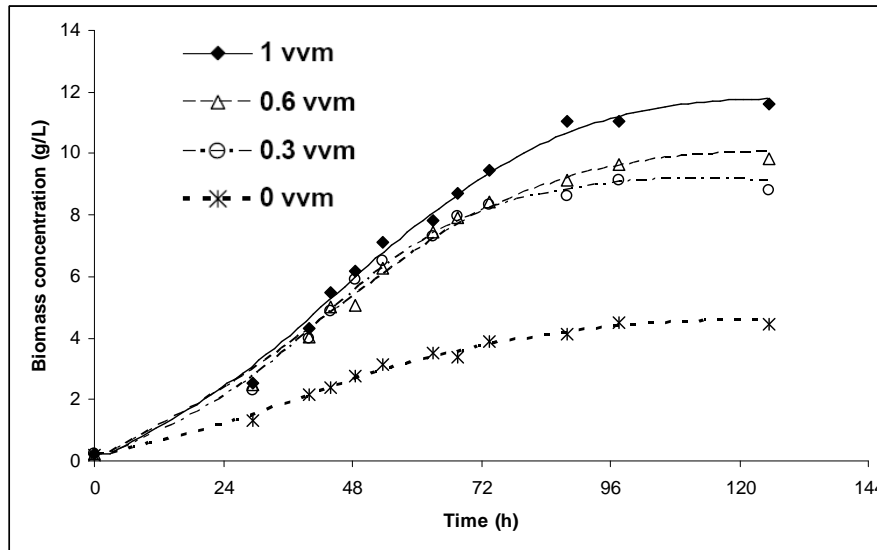


Figure III-1-3. Growth kinetics during the 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.

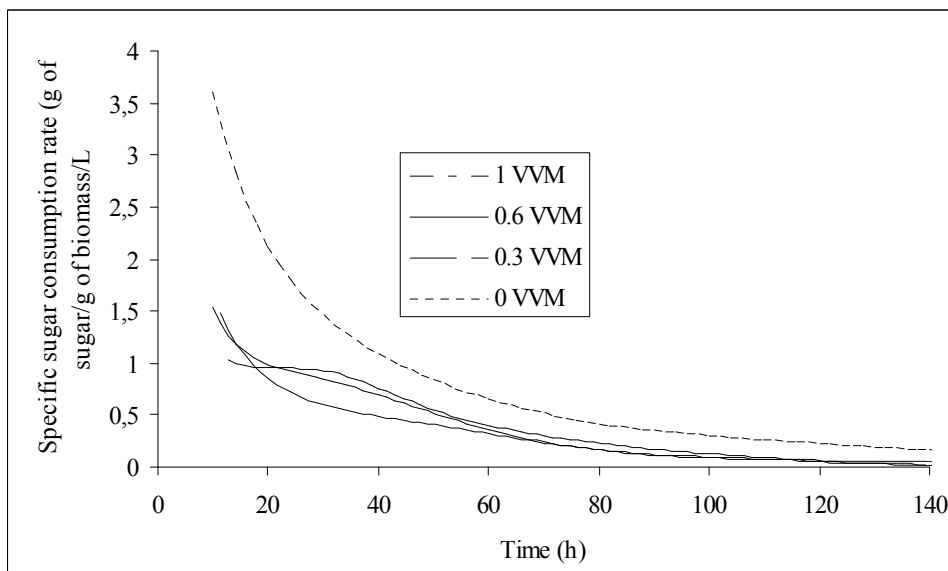


Figure III-1-4. Specific rates of sugar consumption during 4 fermentations with an aeration rate of 0, 0.3, 0.6 and 1 VVM.

III-1-4 Discussion

The objective of using non-*Saccharomyces* yeasts in association with *Saccharomyces* during the AF to enhance the aromatic quality of the wines needs a better knowledge of their ability to develop in winemaking conditions. In this work, the influence of oxygen was studied on the enological strain of *T. delbrueckii*.

The variation of the aeration between 0 VVM and 1 VVM showed that this strain was sensitive to the quantity of provided oxygen. Two types of metabolisms balance took place in the presence or not of oxygen.

In absence of oxygen, the glycerol production of *T. delbrueckii* was favoured and represented 6% of the carbon flux. This value is comparable to data available in literature for *S. cerevisiae* in the same conditions which is around 5 % [22]. In anaerobic conditions, some stages of the Krebs cycle are not active (i.e. succinate dehydrogenase) and the reduced forms of co-factors can not be reoxidized by the respiratory chain. Glycerol production, which involves the oxidation of one NADH in NAD^+ , allows the regeneration of the NADH accumulated in the portions of the active Krebs cycle [8]. This phenomenon might happen with a high efficiency in this *T. delbrueckii* strain which produces important quantities of glycerol in anaerobiosis. Note that this phenomenon was not observed with the same magnitude in all of the strains of *T. delbrueckii* used by Renault et al [20] since they observed lower glycerol productions about 4 g.L^{-1} for 16 strains grown under similar conditions.

In presence of oxygen, the glycerol production is much lower. The presence of oxygen allows the respiratory chain to regenerate the NAD^+ and thus producing more energy. The Krebs cycle will then operate by releasing additional CO_2 resulting in more of this gas produced, compared to the fermentation pathway.

This has been observed for our strain of *T. delbrueckii* since the value of the Respiratory quotient is close to 1 (taking into account the CO_2 produced outside the fermentation reaction). The high amount of available energy is then used by the yeast cell to produce 2 to 3 times more biomass compared to the non-aerated AF.

Since the same amount of nitrogen has been consumed in both cases the biomass is less concentrated in this element leading to a nitrogen percentage in dry weight decreased for yeast grown in aerobiosis.

Therefore, qualitatively, this strain of *T. delbrueckii* seems to have the same metabolism as *S. cerevisiae* strain. According to the literature, this non-*Saccharomyces* is classified among either the negative Crabtree [21] or the positive Crabtree, but with less sensitivity than *Saccharomyces* according to Alves-Araujo et al [2] and Merico et al [15]. These authors explain that, even under limited oxygen condition, the yield of biomass production of *T. delbrueckii* remains more important compared to *S. cerevisiae* due to greater proportion of carbon that will flow in the respiratory metabolism.

The capacity of oxygen uptake by this strain is important. Indeed, even for the highest aeration rate, it was able to consume all the oxygen dissolved in the liquid phase. The specific

consumption of oxygen at this point equals $1.36 \text{ mmole.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. This data is compared with those in the literature: Hanl et al [9] showed that for a strain of *Torulaspora* grown continuously at a growth rate of 0.1 h^{-1} , the minimum needed oxygen to avoid the wash was $0,1 \text{ mmole.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ while oxygen consumption needed to be 100% respiratory metabolism was $2.6 \text{ mmole.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Thus, our strain seems to be in the same range in terms of its oxygen requirements. However, differences observed between the 3 aeration flows on the metabolism as well as on the kinetics are quite low. The extra oxygen consumed by our non-*Saccharomyces* strain in high air flow conditions does not allow the AF to be much faster. Several authors Visser et al [25] and Mauricio et al [14] shown that some strains of *T. delbrueckii* were unable to grow under anaerobic conditions. The conclusions are different for the strain studied in this work. In our experimental conditions, this strain was able to develop and has good performance in anaerobic AF, even if the fermentation was a little longer. The weaker growth is partly offset by a higher specific sugar consumption rate in this case. The observations made by Nissen et al (2004) are contrary to ours: the specific sugar consumption rate of *T. delbrueckii* is lower than that of *S. cerevisiae*.

The yield of conversion of sugars to ethanol for our *Torulaspora* strain is comparable to the one of *S. cerevisiae* strain QA23 grown under anaerobiosis (respectively 0.47 and 0.48 g.g^{-1}) [1]. Nevertheless, the AF of our non-*Saccharomyces* (166 h) was longer compared to this *Saccharomyces* (100 h). In both experiments, anaerobic growth factors were added into the culture medium (ergosterol and oleic acid, as well as Tween 80). These molecules that the yeast can not synthesize in anaerobic conditions, allow it to regenerate its membranes and maintain good viability. However, Mauricio et al [14] showed that the addition of growth factors is less effective for anaerobic growth of *Torulaspora* than for *Saccharomyces*. This was confirmed by Hanl et al (2005). In contrast, these factors seem to be effective to the tested strain of *Torulaspora*. Compared to other strains of *Torulaspora* tested by various authors [0; 3, 20], this strain appears to be a good candidate to be able to carry out AF because it has a good resistance to ethanol, good fermentative qualities and may develop in the absence of significant amounts of oxygen.

Acknowledgements

We would like to thank the Vietnamese and French Governments for providing the grant and Lallemand S.A.S., France for providing yeast strains.

III-1-5 References

1. Akin H, Brandam C, Meyer XM, Strehaiano P (2008) A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*. Chemical Eng Process 47:1986-1993
2. Alves-Araújo C, Pacheco A, Almeida MJ, Spencer-Martins I, Leão C, Sousa MJ (2007) Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. Microbiol 153:898-904
3. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. Int J Food Microbiol 122:312-320
4. Ciani M and Picciotti G (1995) The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. Biotechnol Lett 17:1247-1250
5. Ciani M and Maccarelli F (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World J Microbiol Biotechnol 14:199 - 203
6. Ciani M, Beco L, Comitini F (2006) Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. Int J Food Microbiol 108:239-245
7. Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, and Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Res 10:123-133
8. Furukawa K, Heinzle E, Dunn IJ (1983) Influence of oxygen on the growth of *S. cerevisiae* in continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 25:2293-23 17
9. Hanl L, Sommer P, Arneborg N (2005) The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*. Appl Microbiol Biotechnol 67:113-118
10. Hernández-Orte P, Cersosimo M, Loscos N, Cacho J, Garcia-Moruno E, Ferreira V (2008) The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. Food Chemistry 107:1064-1077
11. Herraiz T, Reglero G, Herraiz M, Martin-Alvarez PJ, Cabezudo MD (1990) The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. American Journal Enol. Vitic. 41:313-318
12. Holm EH, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC, Arneborg N (2001) The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Microbiol 91:541-547
13. Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I, Angulo L (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. Amer J Enol Vitic 47:206-216

14. Mauricio JC, Moreno J, Valero EM, Zea L, Medina M, Ortega JM (1998) Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *World J Microbiol Biotechnol* 14:405-410
15. Merico A, Sulo P, Piškur J, Compagno C (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS Journal* 274: 976-989
16. Moreno JJ, Millán C, Ortega JM, Medina M (1991) Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol* 7:181-189
17. Miller GL (1959) Use of DNS Acid Reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chem* 31:426-428
18. Pillet O, Aguera E, Silvano A, Languet P (2010) Ensemencement séquentiel d'une levure non-*Saccharomyces* et d'une levure *Saccharomyces cerevisiae*, vers de nouveaux horizons aromatiques. *Revue des Œnologues* 135:13-18
19. Pina C, Santos C, António CJ, Hogg T (2004) Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - influence of different culture conditions. *Food Microbiol* 21(4):439-447
20. Renault P, Miot-Sertier C, Marullo P, Hernández-Orte P, Lagarrigue L, Lonvaud-Funel A, Bely M (2009) Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 134:201-210
21. Rodicio R and Heinisch JJ (2009) Sugar metabolism in yeasts. In: König H, Uden G, Frolich J (Eds) *Biology of microorganisms on grape, in must and in wine*. Springer-Verlag, Berlin, pp 113-134
22. Rodrigues F, Ludovico P, Leão C (2006) Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In: Rosa CA, Gabor P (Eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. The Yeast handbook. Springer-Verlag, Berlin pp 101-122
23. Salmon JP and Barre P (1998) Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied Env Microbiol* 64(10):3831-3837
24. Viana F, Gil JV, Genovés S, Vallés S, Manzanares P (2008) Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol* 25:778-785
25. Visser W, Scheffers WA, van der Vegte WHB, van Dijken JP (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56:3785-3792
26. Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2008) Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int J Food Microbiol* 125:197-203

III-2 ANALYSE DES FERMENTATIONS PURES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE S1 ET TORULASPORA DELBRUECKII NSC123

Dans la partie précédente, le but était de déterminer la capacité de consommation de l'oxygène de *T. delbrueckii*. Cependant, en vinification, la présence d'oxygène dans le moût de raisins est très limitée, seulement 5 à 10 mg/L. Les effets de ce paramètre sur la croissance et l'activité fermentaire de nos levures *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sont donc nettement moins marqués. C'est ce que nous allons maintenant présenter dans cette deuxième partie.

Les suivis cinétiques de cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été menés en premier lieu pour déterminer les conditions dans lesquelles seront réalisées les fermentations mixtes dans le bioréacteur à membrane, notamment concernant l'aération. En second lieu, ces fermentations avec les souches pures ont permis d'obtenir les cinétiques de référence des souches pures qui serviront de comparaison avec les cinétiques en culture mixte.

La mise en oeuvre du bioréacteur à membrane implique l'utilisation d'un gaz pour réaliser les surpressions alternatives nécessaires au transfert de liquide d'un pot à l'autre. Afin de s'approcher des conditions de vinification proche de l'anaérobiose, l'utilisation de l'air est à exclure. Nous avons donc choisi d'utiliser l'azote. Cependant, en vinification, l'anaérobiose n'est pas stricte, notamment lors des pratiques de remontage qui consiste à renvoyer avec une pompe du moût du bas vers le haut de cuve. Afin d'évaluer l'impact de l'utilisation de l'azote sur les cinétiques, nous avons réalisé 3 types « d'aération » : la première correspondait à une condition semi-anaérobiose réalisée en Erlen-meyer, la deuxième était en condition d'aération ménagée dans le bioréacteur à membrane sous azote avec des bullages d'air pendant les 2 premiers jours, la troisième était en condition d'anaérobiose stricte dans le BRM sous azote.

La comparaison de ces 3 types d'aération pour la souche de *S. cerevisiae* puis de *T. delbrueckii* est faite dans ce chapitre. Nous terminerons en comparant ces deux souches en culture pure dans les conditions qui seront utilisées pour les cultures mixtes, à savoir la fermentation sous azote.

III.2.1 Les FA pures de *S. cerevisiae*

Les caractéristiques cinétiques et biochimiques des fermentations pures de *S. cerevisiae* réalisées dans les conditions d'aération de semi-anaérobie, aération ménagée et anaérobie strictes sont présentées dans cette partie. Ces 3 conditions ont été réalisées en dupliquat et les résultats présentés sont une moyenne.

Au préalable, il est nécessaire d'évaluer les apports réels d'oxygène occasionnés par nos trois dispositifs expérimentaux.

Pour la fermentation en BRM sous azote, dénommée anaérobie stricte, aucun apport d'oxygène n'est réalisé durant la fermentation. De plus, en raison du fonctionnement du BRM nécessitant des cycles surpressions/dégazement de chacun des pots, l'oxygène dissous qui pourrait être initialement présent dans le milieu est nul. Il s'agit donc bien d'une anaérobie complète.

Pour la fermentation en erlenmeyer, dénommée semi-anaérobie, l'apport d'oxygène n'est pas contrôlé. Le milieu initial est saturé en oxygène dissous et par la suite le transfert d'oxygène peut se faire à l'interface entre l'air ambiant et le milieu de fermentation. Ce transfert est facilité par l'agitation orbitale. Cependant, la quantification des apports d'oxygène est difficile à faire dans ce cas mais elle peut être considérée assez conséquente, bien supérieure à ce qu'un moût de raisin reçoit en vinification. Par exemple Sumino et al., (1972) ont montré qu'une fiole d'erlenmeyer de 200 mL contenant 40 mL de liquide et agité à 204 rpm en agitation orbitale avait la même capacité de transfert d'oxygène (Kla) qu'un fermenteur aéré à 0,3 VVM et agité mécaniquement à 100 rpm.

Pour la fermentation en BRM sous azote avec aération ponctuelle en air, dénommée aérobie ménagée, le protocole était de faire buller de l'air pendant 36 minutes dans le milieu à un débit de 2 L/min (soit 1 VVM puisque le volume utile est de 2L), au temps initial de fermentation, à 17 h et à 24 h. L'évolution de la concentration en oxygène dissous pour ces ajouts pendant la culture de *S. cerevisiae* est présentée sur la Figure III-2-1 ainsi que pour un milieu témoin ne contenant pas de levures.

Les résultats montrent que pour tous les bullages, 36 min d'aération permettent d'atteindre une concentration d'oxygène dissous de 8,8 mg/L, soit très proche de la valeur théorique de saturation (9,1 mg/L à 20 °C). La concentration en oxygène dissous diminue ensuite rapidement dès l'arrêt du bullage. Cependant, dans l'essai témoin réalisé en absence de levures, la concentration en oxygène dissous chute également. Ceci peut être attribué aux cycles de dégazage/pressurage de l'azote nécessaire au fonctionnement du BRM. La chute de la concentration en oxygène dissous dans les fermentations avec levures ne peut donc pas être totalement attribuée à sa consommation. Seul l'écart de concentration entre le témoin et les fermentations correspond à la consommation réelle d'oxygène par les levures. La Figure III-2-1 montre clairement que cet écart augmente entre les bullages réalisés à 0 h et à 24 h,

traduisant une consommation d'oxygène plus rapide liée certainement à l'augmentation de la population levurienne entre 0 h et 24 h. Pour les 3 bullages, la concentration en oxygène dissous que l'on peut considérer comme réellement consommée par les levures est alors égale à : 1,79 ; 2,25 et 2,57 mg/L pour les bullages réalisées à 0, 17 et 24 h. Donc au total, ce sont 6,68 mg/L d'oxygène qui ont été utilisés par rapport à la fermentation sous azote sans bullage. Pour ce calcul, la consommation d'oxygène des levures durant le bullage a été négligée comme le justifie les points expérimentaux à 24 min où l'essai sans levure se situe au milieu du faisceau des autres essais.

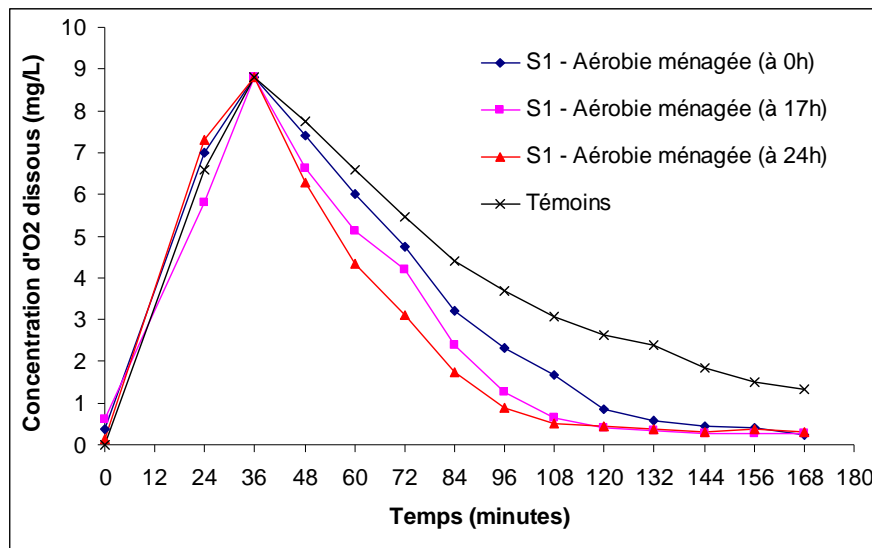


Figure III-2-1. Evolution de l'oxygène dissous (avec la variation moins de 5 %) après chaque l'aération du milieu au temps (0h ; 17 h et 24 h) de la FA aération ménagée de *S. cerevisiae*

La faible quantité d'oxygène apportée pour cet essai peut être légitimement considérée comme moins importante que la quantité d'oxygène apportée dans les erlenmeyers, même si la quantification n'est pas possible pour ce cas là. L'aération ménagée est donc un cas intermédiaire en termes d'apport d'oxygène entre l'aérobie stricte et la semi-aérobie.

III-2-1-1 Cinétiques de FA pures de *S. cerevisiae*

Consommation des sucres

Les cinétiques de consommation du glucose et des sucres totaux de *S. cerevisiae* sont présentées dans les Figure III-2-2A et Figure III-2-2B.

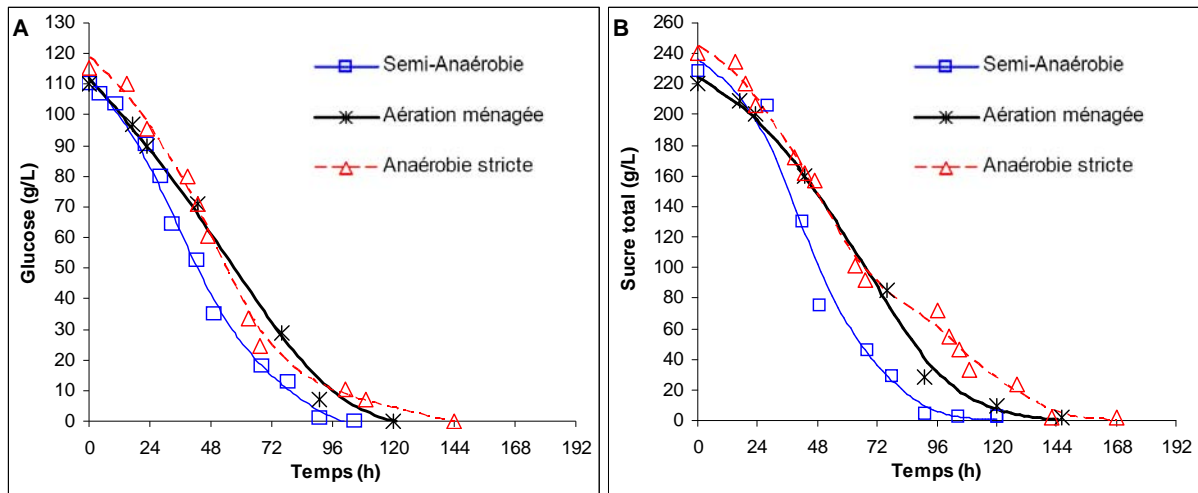


Figure III-2-2. Cinétiques de consommation du sucre (A : Glucose et B : Sucre total) de *S. cerevisiae*

La Figure III-2-2A montre que, quels que soient les modes d'aération, la levure *S. cerevisiae* a été capable de consommer la totalité des sucres. En observant les temps de consommation, on constate que systématiquement le glucose est épuisé plus tôt (1 à 2 jours) que les sucres totaux traduisant ainsi la préférence de cette levure pour le glucose plutôt que le fructose (cf Figure III-2-2B). La comparaison des modes d'aération montrent que les apports d'oxygène ont favorisé la vitesse de consommation des sucres : c'est en condition semi-anaérobie que cette levure a fermenté le plus rapidement 97 % des sucres initiaux, en 94 h, contre 120 h pour l'aération ménagée et 144 h pour l'anaérobie stricte.

Croissance cellulaire et production de biomasse

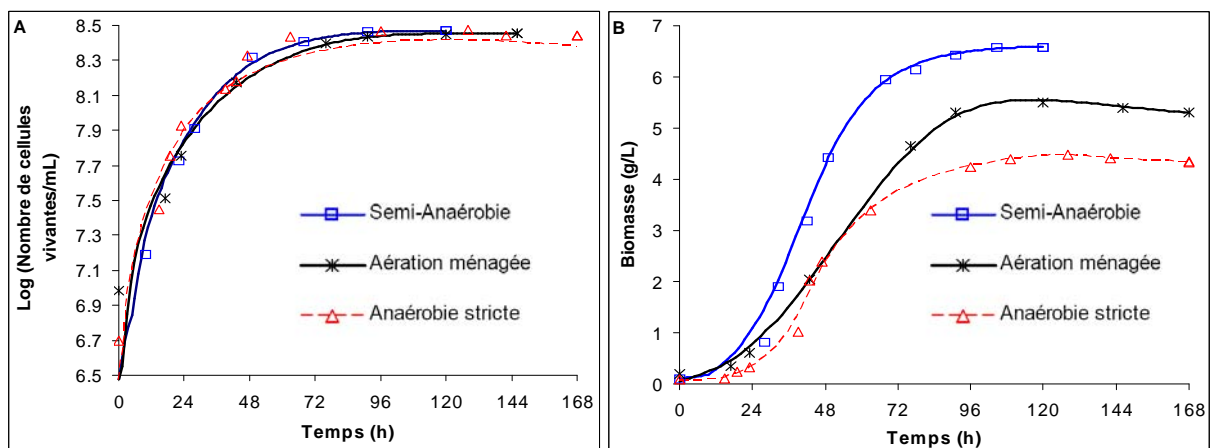


Figure III-2-3. Cinétiques de la croissance (A : Cellules vivantes et B : Biomasse) de *S. cerevisiae*

La Figure III-2-3A montre que *S. cerevisiae* a eu le même profil de croissance quelles que soient les conditions de FA. Deux phases distinctes apparaissent : une croissance les 3 premiers jours pour atteindre une population maximale au début du quatrième jour, puis une phase stationnaire où la population se maintient. Aucune phase de latence n'est observée pour les 3 conditions d'aération. Cependant, plus l'oxygène est présent dans le milieu fermentaire plus la levure *S. cerevisiae* se développe. En condition semi-anaérobie, le nombre de cellules vivantes a atteint un maximum à 290×10^6 cellules/mL contre 270×10^6 cellules/mL et 250×10^6 cellules/mL pour les conditions aération ménagée et anaérobie stricte (tableau I -1). Cela est encore plus flagrant sur les courbes de biomasse (cf Figure III-2-3B) et sur les quantités de biomasse formées (cf Tableau III-2-1) de 6,6 g/L, 5,5 g/L et 4,5 g/L respectivement dans l'ordre de l'apport d'oxygène. La valeur maximale des cellules vivantes n'est pas totalement linéaire avec celle de la quantité de biomasse car cette dernière inclue les cellules mortes.

Productions de glycérol et d'éthanol

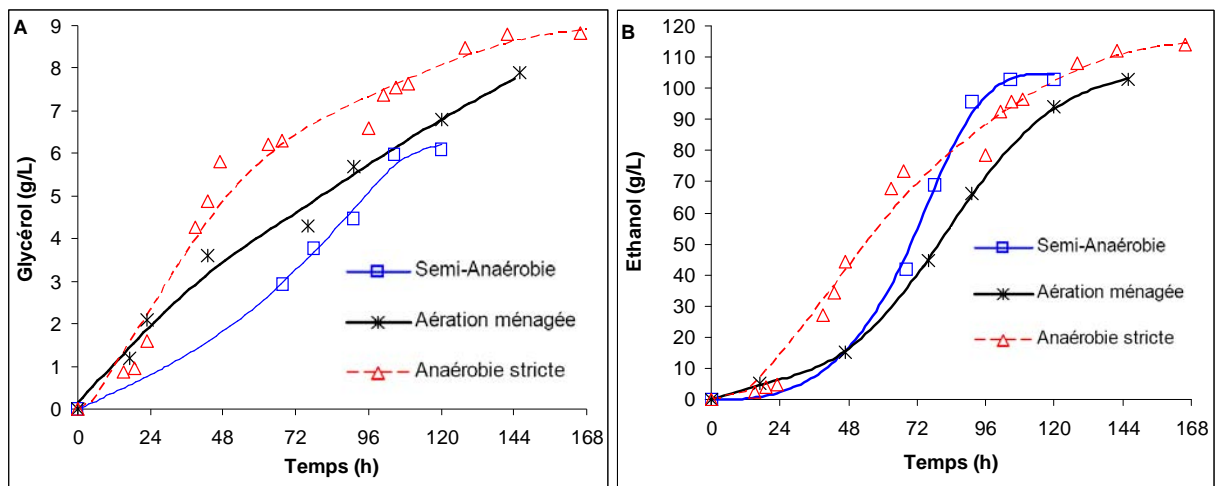


Figure III-2-4. Cinétiques de production de glycérol (A) et d'éthanol (B) de *S. cerevisiae*

Les Figure III-2-4A et Figure III-2-4B montrent que glycérol et éthanol sont produits tout au long de la FA, parallèlement à la consommation des sucres. Les quantités d'éthanol produites sont sensiblement les mêmes pour les fermentations semi-aérobie et aération ménagée (103 g/L - 104 g/L) et un peu plus importantes (115 g/L) en anaérobie stricte. Ceci paraît logique car la biomasse produite étant moins importante dans ce cas, plus de sucres peuvent être utilisés pour la voie fermentaire. En ce qui concerne le glycérol, la quantité produite est inversement proportionnelle à la quantité d'oxygène apportée : 6,2 g/L pour la semi-aérobie, 7,8 g/L pour l'aération ménagée et 9 g/L pour l'anaérobie stricte (cf Figure III-2-3).

Composition du moût après fermentation

Le Tableau III-2-1 donne les concentrations finales des principaux composés analysés en fin de fermentation. Les valeurs de sucres, éthanol, glycérol et durée de fermentations ont déjà été commentées. Pour l'azote alpha-aminé résiduel, quelle que soit l'aération, nous constatons que sa concentration est identique, de l'ordre de 5 mgN/L. Donc, sur les 324 mgN/L initiaux présents dans le moût MS300, 319 mgN/L ont été consommés en formant pourtant des quantités de biomasse différentes. On peut donc supposer que la proportion d'azote dans la biomasse est plus importante dans la condition anaérobie stricte que semi-aérobie (non mesuré).

Tableau III-2-1. Caractéristiques biochimiques des vins fermentés par *S. cerevisiae*

<i>Paramètres cinétiques</i>	<i>Semi-anaérobie</i>	<i>Aération ménagée</i>	<i>Anaérobie stricte</i>
Durée de la FA (h)	94	120	144
Biomasse maximale (g/L)	6,6	5,5	4,5
Concentration cellulaire vivante maximale (10 ⁶ /mL)	290	270	250
Glycérol (g/L)	6,2	7,8	9,0
Ethanol (g/L)	104,5	103,3	115,0
N α aminé résiduel (mg/L)	5,41	4,21	5,59
pH	3,32	3,24	3,40
Acide acétique (g/L)	1,79	1,05	0,58
Acide malique (g/L)	4,56	4,58	4,98
Acide lactique (g/L)	0,15	0,41	0,26

Il apparait également une consommation partielle de l'acide malique par *S. cerevisiae* dans toutes les FA puisqu'il en reste entre 4,6 g/L et 5 g/L sur les 6 g/L initiaux. Par ailleurs, la concentration finale d'acide lactique varie de 0,15 g/L à 0,41 g/L. Enfin, *S. cerevisiae* a produit plus d'acide acétique dans la FA semi-anaérobie (1,79 g/L) que lors de l'aération ménagée (1,05 g/L) et l'anaérobie stricte (0,58 g/L). Les valeurs finales de pH sont assez proches entre les 3 modalités, entre 3,24 et 3,4 pour un pH initial aux alentours de 3,35.

III-2-1-2 Paramètres cinétiques des FA pures de *S. cerevisiae*

Les paramètres cinétiques des FA pures de *S. cerevisiae* sont récapitulés dans le Tableau III-2-2. Afin que les vitesses de FA soient comparables, celle-ci est considérée achevée quand

97 % du sucre initial est consommé. Les caractéristiques cinétiques ont été calculées sur la base de ce temps.

Tableau III-2-2. Paramètres cinétiques des FA pures de *S. cerevisiae*

Paramètres cinétiques	Semi-anaérobie	Aération ménagée	Anaérobie stricte
Y_P (g/g)	0,46	0,47	0,48
P_P (g/L/h)	1,11	0,86	0,80
Y_X (g/g)	0,027	0,024	0,017
R_S (g/L/h)	2,44	1,81	1,65
μ_{max} (h ⁻¹)	0,37	0,30	0,12
q_{smax} (g sucre/ g biomasse/h)	12,38	9,85	8,24

Le rendement Y_P d'éthanol produit sur sucres consommés diminue avec l'apport d'oxygène, passant de 0,48 g/g pour l'anaérobie stricte à 0,46 g/g pour la fermentation en semi-aérobie. Au contraire, tous les autres paramètres calculés augmentent avec l'aération. Le rendement de biomasse produite par rapport aux sucres consommés Y_X est le plus élevée (0,027 g/g) en semi-aérobie et le plus faible en anaérobie stricte (0,017 g/g). Les vitesses moyennes de production d'éthanol P_P et de consommation de sucres R_S augmentent logiquement puisque les temps de fermentation ont été plus courts. Les vitesses spécifiques maximales de croissance μ_{max} et de consommation des sucres q_{smax} sont également plus importantes avec l'augmentation de l'apport d'oxygène.

III-2-1-3 Discussion

La réalisation des fermentations avec la souche de *S. cerevisiae* pour 3 conditions d'aération a mis en évidence le rôle de l'oxygène sur le métabolisme de cette levure. De nombreuses études ont déjà été réalisées sur ce thème (Mauricio et al., 1991 ; 1998, Rojas et al., 2001) et nos résultats viennent confirmer ce qui a déjà été décrit. La présence d'oxygène dans un milieu fermentaire permet le fonctionnement de la chaîne respiratoire pour les levures *S. cerevisiae*, ce qui génère pour une même quantité de sucres consommés 18 à 19 fois plus d'énergie (molécules d'ATP) que la voie fermentaire seule. En effet, le NADH produit dans le cycle de Krebs est directement réoxydé en NAD^+ en présence d'oxygène ce qui s'accompagne par la production d'une quantité importante d'énergie utilisée pour la conversion du carbone des sucres en biomasse.

En anaérobie, certaines étapes du cycle de Krebs ne sont pas actives (succinate déshydrogénase par exemple) ce qui empêche la réalisation totale du cycle. La production de

glycérol qui fait intervenir l'oxydation d'un NADH en NAD⁺ permet alors de régénérer le NADH accumulé dans les portions du cycle de Krebs actives (Furukawa et al., 1983). Cependant l'énergie produite n'est pas suffisante pour la production de biomasse. Les sucres sont alors dirigés vers la voie fermentaire avec la production d'éthanol et de CO₂.

Les résultats quantitatifs obtenus sur nos 3 essais vont dans ce sens. La fermentation où l'apport d'air est le plus important est celle où la biomasse produite est la plus grande alors que la fermentation en anaérobie est celle où le glycérol et l'éthanol formés sont les plus importants. La fermentation avec aération ménagée a des résultats intermédiaires aux deux autres.

Par ailleurs, il est connu que les apports d'oxygène améliorent la teneur en stérols et acides gras insaturés des membranes cellulaires des levures (Mauricio et al., 1991 ; 1998). Ceci, ajouté au surplus de biomasse produit, entraîne une meilleure activité des levures ce qui se traduit dans nos essais par des valeurs de vitesse spécifique de croissance et de consommation des sucres plus élevées. Les durées de fermentation sont alors réduites avec apport d'oxygène puisqu'il y a plus de biomasse présente et que cette biomasse a une meilleure activité. Ainsi, nous observons un écart de 50 h entre les fermentations semi-aérobie et anaérobie, l'aération ménagée se situant là encore entre les deux.

La présence dans notre milieu de fermentation de lipides comme l'ergostérol (15 mg/L) ou l'acide oléique (5 mg/L) a pu par ailleurs stimuler la FA de *S. cerevisiae* dans les conditions d'aération ménagée et d'anaérobie stricte. En effet, Mauricio et al., (1998) ont montré que l'addition d'ergostérol (25 mg/L) et d'acide oléique (31 mg/L) avait permis dans leurs conditions d'atteindre des niveaux comparables de croissance cellulaire et d'activité fermentaire de *S. cerevisiae* en condition anaérobie par rapport à des conditions de semi-aérobie. L'existence d'une synergie entre les facteurs anaérobies et l'apport ponctuel d'air avait été également montré avec notamment une augmentation des vitesses spécifiques de croissance et de consommation des sucres (Mauricio et al., 1998).

Dans notre étude, les concentrations d'acide acétique obtenues avec les FA dans les conditions d'aération ménagée et d'anaérobie sont inférieures au seuil acceptable en œnologie (1,1 g/L). Pour le cas de la FA semi-anaérobie, elle est supérieure à ce seuil (1,76 g/L). En général, l'acide acétique est produit de 0,1 g/L à quelques g/L par *S. cerevisiae* au cours de la FA, suivant la présence d'oxygène. Ciani et al., (2000) ont trouvé qu'une souche de *S. cerevisiae* avait produit jusqu'à 3,63 g/L d'acide acétique en condition aérobie par rapport à 0,80 g/L en condition anaérobie. En fait, pendant la FA, l'acide acétique est produit par l'hydrolyse de l'acétyl-CoA issu de la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique par la pyruvate déshydrogénase, mais cette réaction, qui se déroule dans les mitochondries, est limitée en anaérobiose.

S. cerevisiae peut aussi métaboliser une partie de l'acide malique pour produire de l'éthanol via l'enzyme malique (Boles et al., 1998). Dans notre étude, les proportions d'acide malique consommé par *S. cerevisiae* varient entre 17 % et 24 % de la concentration initiale, ce qui est classique pour des souches œnologiques (Ribereau-Gayon et al., 1998).

III-2-2 Les FA pures de *T. delbrueckii*

Comme mentionné dans le Tableau II-1 de la partie II.1.1 (Matériel et Méthodes), deux lots différents de *T. delbrueckii* ont été utilisés dans cette étude. Ces lots ont été produits sous forme de LSA en 2007 pour le lot 1 et en 2008 pour le lot 2. Les caractéristiques du lot 2 étaient : 39 % de protéines, 90 % matières solides, $2,00 \times 10^{10}$ cellules viables/g et $4,39 \times 10^{10}$ cellules totales/g. Pour le lot 1, les caractéristiques étaient : 27 % de protéines, 90 % matières solides, $6,44 \times 10^{10}$ cellules viables/g et $9,76 \times 10^{10}$ cellules totales/g.

Pour le lot 1, les FA pures de *T. delbrueckii* ont été réalisées dans les mêmes conditions d'aération que celles présentées pour *S. cerevisiae* : semi-anaérobie, aération ménagée et anaérobie stricte. Pour le lot 2, seule l'anaérobie stricte a été réalisée. Comme pour *S. cerevisiae*, les résultats présentés dans ce paragraphe sont la moyenne de fermentations dupliquées.

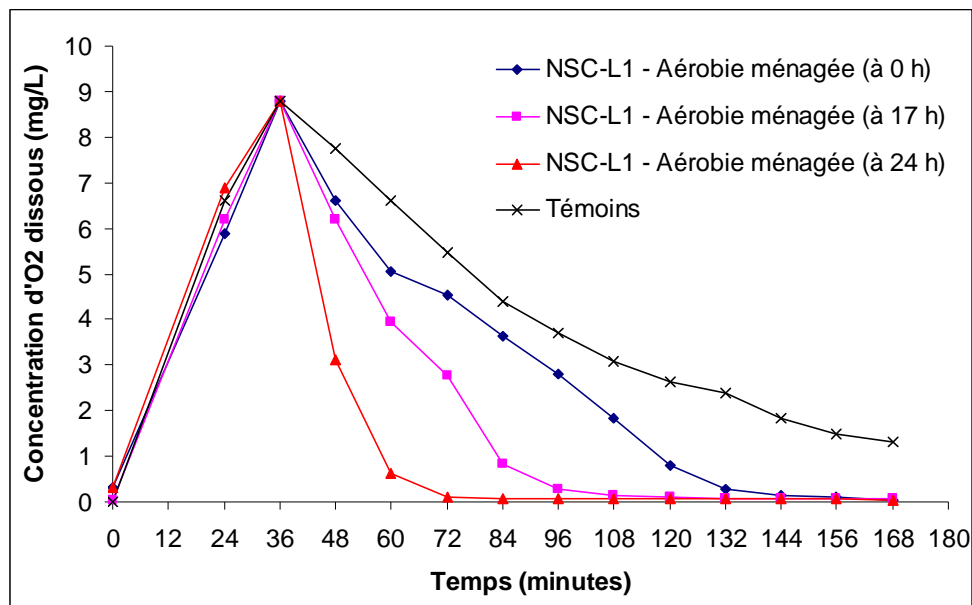


Figure III-2-5. Temps de consommation de l'oxygène par *T. delbrueckii* lot 1, après chaque l'aération du milieu à temps (0 h ; 17 h et 24 h) de la FA aération ménagée

Il est possible, comme pour *S. cerevisiae*, d'évaluer la quantité d'oxygène réellement consommée par les *T. delbrueckii* lot 1 lors de l'essai aération ménagée. L'évolution de la

concentration en oxygène dissous après bullage de 2 L/min (1 VVM) d'air pendant 36 minutes à 0 h ; 17 h et 24 h est présentée sur la Figure III-2-5. La différence entre le témoin et les fermentations avec présence de levures correspond à l'oxygène consommé. Là encore, la quantité augmente entre le bullage à 0 h et celui à 24 h en raison de l'augmentation de la population entre ces deux temps. Nous avons une consommation de 2,08 mg/l à 0 h, 3,41 mg/l à 17 h et 5,34 mg/L à 24 h, ce qui fait un cumul pour la fermentation de 10,82 mg/l d'oxygène. Les écarts entre l'essai témoin et les 3 autres durant les 36 min de bullage étant très faibles, nous avons négligé l'oxygène consommé par les levures durant ce temps là.

III-2-2-1 Cinétiques de FA pures de *T. delbrueckii*

Consommation des sucres

Les cinétiques de consommation du glucose et des sucres totaux lors des FA de *T. delbrueckii* lot 1 pour les 3 conditions d'aération et pour *T. delbrueckii* lot 2 pour la condition anaérobie stricte sont présentées sur les Figure III-2-6A et Figure III-2-6B.

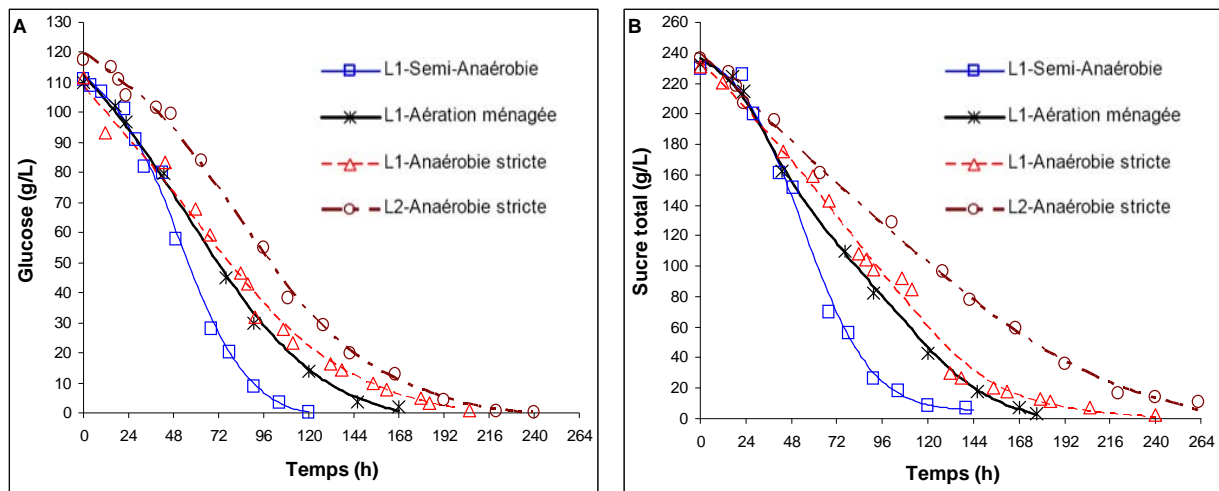


Figure III-2-6. Cinétiques de consommation du sucre (A : Glucose et B : Sucre total) dans les FA pures de *T. delbrueckii* lot 1 (L1) et lot 2 (L2) dans les différentes conditions d'aération

La souche *T. delbrueckii* lot 1 et lot 2 a été capable d'atteindre le critère défini comme la fin de la fermentation (consommation de 97 % des sucres initiaux) quel que soit le mode d'aération testé. Cette souche est toutefois plus glucophile que fructophile puisque l'épuisement des sucres totaux a lieu environ 30 h après l'épuisement du glucose dans tous les cas. Plus l'apport d'oxygène est important et plus la FA s'est terminée rapidement : au bout de 5 jours en semi-anaérobie, 7 jours pour l'aération ménagée et 8 jours pour l'anaérobie stricte.

Il est également possible de comparer *T. delbrueckii* lot 2 au lot 1 dans les conditions d'anaérobiose stricte. La cinétique de FA du lot 2 a été moins rapide puisque les sucres totaux ont été épuisés 3 jours après l'épuisement des sucres dans la FA réalisée avec le lot 1.

Croissance cellulaire et production de biomasse

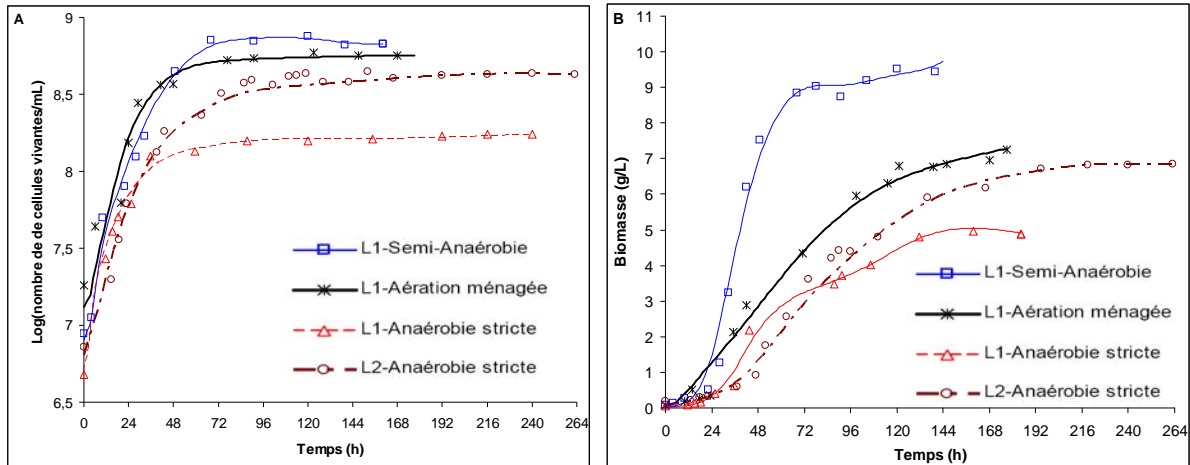


Figure III-2-7. Cinétiques de la croissance de *T. delbrueckii* lot 1 (L1) et lot 2 (L2) (A : cellulaire vivante et B : biomasse) dans les FA pures

La Figure III-2-7A montre que *T. delbrueckii* lot 1 et lot 2 ont des courbes de croissances similaires avec ou sans apport d'oxygène : une phase exponentielle qui dure 3 jours environ suivi d'une phase stationnaire. Aucune véritable phase de latence n'a été détectée. Par contre le niveau maximum atteint pour les cellules viables ou la biomasse sont très variables. La souche *T. delbrueckii* lot 1 a atteint la concentration cellulaire maximum de 740×10^6 cellules vivantes/mL dans la FA semi-anaérobiose, en comparaison à 565×10^6 cellules vivantes/mL dans la FA aération ménagée et seulement 170×10^6 cellules vivantes/mL dans la FA anaérobiose stricte. *T. delbrueckii* lot 2 a atteint sa concentration cellulaire maximum à 430×10^6 cellules vivantes/mL. Nous retrouvons les mêmes tendances pour la production de biomasse totale : 9,5 g/L à la fin de la FA semi-anaérobiose, 7,2 g/L pour la FA de l'aération ménagée et seulement 5,1 g/L pour l'anaérobiose stricte. Cette valeur est de 6,8 g/L à la fin de la FA de *T. delbrueckii* lot 2 en anaérobiose stricte (cf. Figure III-2-7B)

Donc en résumé, plus l'apport d'oxygène est important, plus la biomasse produite est importante et plus la FA est courte. Il existe également une importante variabilité entre l'activité fermentaire des lots puisque le lot 2, pour des mêmes conditions d'anaérobiose, a produit 2,5 fois plus de cellules viables que le lot 1 mais a consommé moins vite les sucres en rallongeant le temps de fermentation de 33 %.

Productions de glycérol et d'éthanol

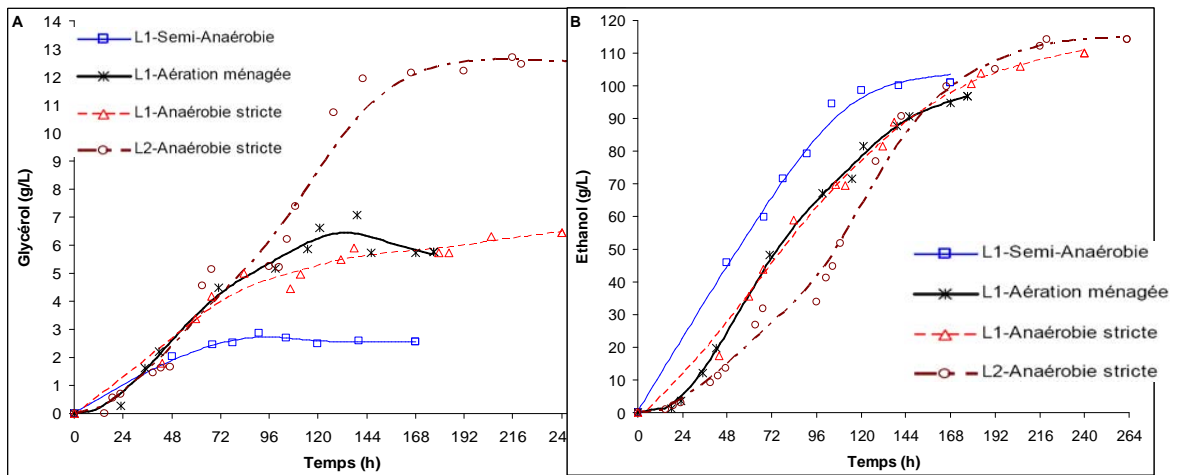


Figure III-2-8. Cinétiques de production de glycérol (A) et d'éthanol (B) dans les FA pures de *T. delbrueckii* dans les différentes conditions d'aération

La Figure III-2-8A montre également que la production de glycérol a été influencée par la présence de l'oxygène et par le lot de levures. La concentration maximale de glycérol dans la FA semi-anaérobie avec *T. delbrueckii* lot 1 n'a atteint que 2,6 g/L, par rapport à 6,5 g/L dans les FA aération ménagée et anaérobie stricte (cf Figure III-2-8A). Donc l'apport d'oxygène a diminué la production de glycérol. Par ailleurs, la différence de production de glycérol entre les deux lots de levures est très importante puisque le lot 2 en a produit deux fois plus que le lot 1 (cf. Tableau III-2-3). Les quantités d'éthanol produites sont sensiblement les mêmes pour les fermentations semi-aérobie et aération ménagée (entre 98 et 103 g/L) et un peu plus importantes (111 g/L) en anaérobie stricte. Ceci paraît logique car la biomasse produite étant moins importante dans ce cas, plus de sucres peuvent être utilisés pour la voie fermentaire. La levure lot 2 (114 g/L) a cette fois produit à peu près la même quantité d'éthanol que la levure lot 1 (111g/L) dans les conditions anaérobie (cf Figure III-2-8B).

Composition du moût après fermentation

Le Tableau III-2-3 donne les concentrations finales des principaux composés analysés en fin de fermentation. Quelle que soit l'aération, nous constatons que l'azote alpha-aminé résiduel est identique pour la *T. delbrueckii* lot 1, de l'ordre de 35 mgN.L⁻¹, ce qui correspond donc à une consommation de 290 mgN.L⁻¹. Les quantités de biomasse formée suivant l'aération étant très différentes, la proportion d'azote dans la biomasse doit être donc différente dans la formule intrinsèque de la levure (non mesuré). Pour la levure lot 2, ce sont 300 mgN.L⁻¹ qui ont été consommés.

Tableau III-2-3. Caractéristiques biochimiques des vins fermentés par *T. delbrueckii*

	<i>L1-Semi-anaérobie</i>	<i>L1-Aération ménagée</i>	<i>L1-Anaérobie stricte</i>	<i>L2-Anaérobie stricte</i>
Durée de la FA (h)	120	165	194	260
Biomasse maximale (g/L)	9,5	7,2	5,1	6,8
Concentration cellulaire vivante initiale (10^6 /mL)	15	15	15	10
Concentration cellulaire vivante maximale (10^6 /mL)	740	565	170	430
Glycérol (g/L)	2,6	6,44	6,48	12,4
Ethanol (g/L)	103,4	98,6	110,9	114,0
Nα aminé résiduel (mg/L)	35,25	36,8	31,24	26,5
pH	3,34	3,33	3,32	3,35
Acide acétique (g/L)	1,32	0,14	0,11	0,09
Acide succinique (g/L)	1,16	1,18	1,10	ND
Acide malique (g/L)	4,63	4,22	5,13	5,15

Une consommation d'acide malique entre 1,8 et 0,9 g/L est constatée alors que la production d'acide lactique ne dépasse pas 0,32 g/L. La production d'acide succinique a été assez importante (1,1g/L environ) pour la souche lot 1 quelle que soit l'aération alors que la souche lot 2 n'en a pas produit. L'acide acétique a également atteint des niveaux élevés, à 1,32 g/L dans le cas de la fermentation semi-aérobie alors que pour les conditions avec peu d'apport d'oxygène, la concentration n'a pas dépassé 0,14 g/L pour le lot 1 et le lot 2. Enfin, les valeurs finales de pH sont très proches pour les 3 conditions d'aération, autour de 3,33.

III-2-2-2 Paramètres cinétiques des FA pures de *T. delbrueckii*

Les paramètres cinétiques des FA pures de *T. delbrueckii* lot 1 et lot 2 sont récapitulés dans le Tableau III-2-4. Pour la levure lot 1, le rendement Y_P d'éthanol produit sur sucres consommés diminue avec l'apport d'oxygène, passant de 0,49 g/g pour l'anaérobie stricte à 0,45 g/g pour la fermentation en semi-aérobie. Au contraire, tous les autres paramètres calculés augmentent avec l'aération. Le rendement de biomasse produite par rapport aux sucres consommés Y_X est le plus élevée (0,039 g/g) en semi-aérobie et le plus faible en anaérobie stricte (0,021 g/g). Les vitesses moyennes de production d'éthanol P_P et de consommation de sucres R_S augmentent logiquement puisque les temps de fermentation ont

été plus courts. Les vitesses spécifiques maximales de croissance μ_{\max} et de consommation des sucres q_{smax} sont également plus importantes avec l'augmentation de l'apport d'oxygène.

Tableau III-2-4. Paramètres et caractéristiques cinétiques des FA pures de *T. delbrueckii*

Paramètres cinétiques	L1-Semi-anaérobie	L1-Aération ménagée	L1-Anaérobie stricte	L2-Anaérobie stricte
Y_P (g/g)	0,45	0,43	0,49	0,49
P_P (g/L/h)	0,86	0,60	0,57	0,44
Y_X (g/g)	0,039	0,029	0,021	0,027
R_S (g/L/h)	1,91	1,39	1,17	0,89
μ_{\max} (h^{-1})	0,44	0,28	0,21	0,17
q_{smax} (g sucre/g biomasse x h)	13,87	11,90	8,86	7,71

La comparaison des lots 1 et 2 montre que la levure lot 2 a des performances fermentaires moins bonnes que la levure lot 1. Son μ_{\max} et q_{smax} sont moins importants et sa vitesse moyenne de consommation des sucres est moins bonne.

III-2-2-3 Discussion

T. delbrueckii est une levure respirofermentaire qui est souvent présente au cours de la FA spontanée du vin (Kreger van Rij 1984 ; Ribéreau-Gayon et al., 1989). Dans notre étude, cette levure non-*Saccharomyces* a pu achever la fermentation (selon notre critère de 97 % des sucres consommés) en présence ou en absence d'oxygène, même si l'apport d'oxygène a favorisé sa cinétique. La capacité d'achèvement de la FA est un caractère œnologique très important pour les levures. Dans la littérature, plusieurs études rapportent que différentes souches de *T. delbrueckii* se sont souvent montrées incapables de réaliser la FA, même après plusieurs semaines (Mauricio et al., 1998 ; Tataridis, 2001 ; Bely et al., 2008). Visser et al., (1990) avaient montré qu'en anaérobiose, même en présence d'ergostérol et d'acide oléique, *T. delbrueckii* se développait très faiblement sur un milieu riche à 20 g/L de glucose ($\mu_{\max} = 0,03 \text{ h}^{-1}$). Pour *T. delbrueckii* lot 1, la concentration cellulaire a atteint un maximum pour la FA en semi-anaérobie qui s'est également montré plus rapide que les autres. Nos résultats correspondent à ceux de Nissen et al., (2004) qui ont trouvé que le μ_{\max} et la concentration cellulaire maximale de *T. delbrueckii* ont augmenté de $0,33 \text{ h}^{-1}$ et $47 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ pour une FA anaérobie à $0,43 \text{ h}^{-1}$ et $94 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ pour une FA semi-anaérobie dans des conditions de milieu de culture comparables aux nôtres.).

L'effet de l'oxygène sur le métabolisme de cette souche de *T. delbrueckii* est assez comparable à celui observé et déjà présenté dans le paragraphe précédent pour *S. cerevisiae*.

L'apport d'oxygène favorise la respiration et donc la production de l'énergie nécessaire à la multiplication de la biomasse. En absence d'oxygène, on assiste à une production plus importante de glycérol pour régénérer le NADH nécessaire à la fermentation. Notons tout de même la différence de production de glycérol entre la souche du lot 1 et du lot 2. Cette dernière atteint des niveaux élevés comparable à ceux trouvés par Bely et al., (2008) pour certaines souches de *T. delbrueckii* qui ont atteint 15 g/L à 17 g/L mais pour un moût de raisin initial à 360 g/L.

Le phénomène de production plus importante d'acide acétique en présence d'oxygène déjà observé sur la souche de *S. cerevisiae* se retrouve également pour cette souche de *T. delbrueckii*.

III-2-3 Comparaisons des FA pures entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*

Nous venons de voir l'impact des différentes conditions d'oxygénation sur les cinétiques de fermentations des levures *S. cerevisiae* puis *T. delbrueckii*. Dans ce paragraphe, nous reprenons certains de ces résultats pour comparer les souches entre elles.

III-2-3-1 Comparaisons des fermentations pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 1 dans les conditions de semi-anaérobie et d'aération ménagée

Les Figure III-2-9 et Figure III-2-10 comparent les concentrations finales des principaux produits dans les milieux fermentés par *T. delbrueckii* Lot 1 et *S. cerevisiae* dans les conditions de semi-aérobie et aération ménagée. Pour les deux conditions, une différence notable se situe au niveau de la quantité de biomasse formée et du temps de fermentation, ces deux paramètres étant plus grands pour *T. delbrueckii*. Ceci signifie que malgré un nombre de cellules plus important, les sucres sont fermentés moins vite. La levure *S. cerevisiae* a également formée plus d'acide acétique que la *T. delbrueckii*. Pour le reste, les concentrations sont sensiblement identiques que ce soit pour l'éthanol et l'acide lactique formés, l'acide malique consommé et le pH final. La levure *S. cerevisiae* consomme tout de même un peu plus d'azote que la *T. delbrueckii* Lot 1 (malgré une biomasse formée moins importante) et produit un peu plus de glycérol. Pour la condition d'aération ménagée, on a pu mesurer également que *T. delbrueckii* consommait plus vite l'oxygène mis à sa disposition et que cette oxygénation avait une plus grande influence sur son nombre de cellules et sa vitesse de fermentation que pour *S. cerevisiae*.

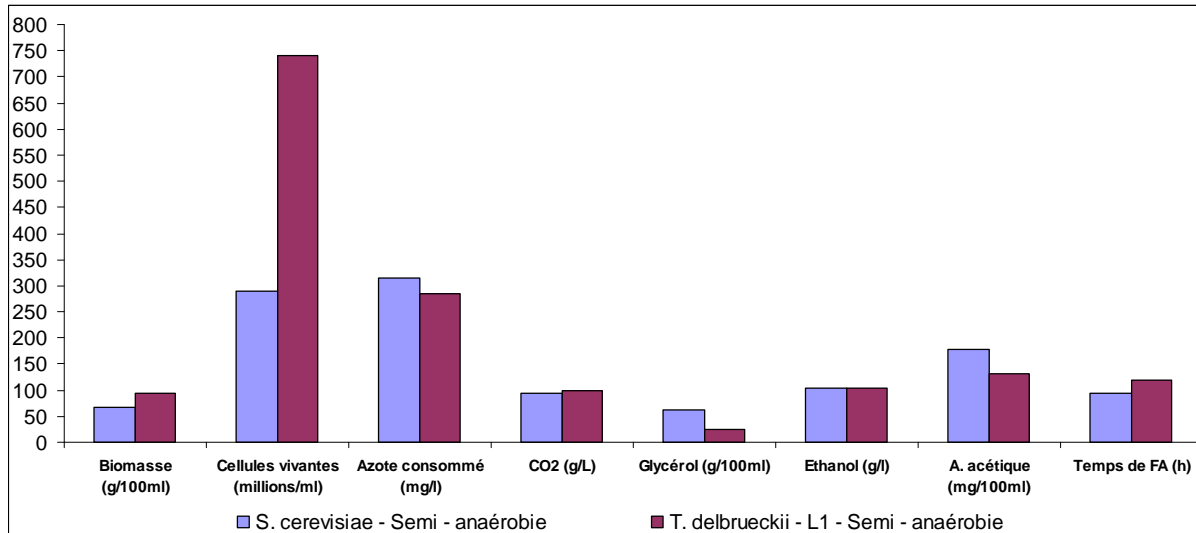


Figure III-2-9. Caractéristiques cinétiques et biochimiques des FA pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 1 dans la condition semi-anaérobie (A) et l'aération ménagée (B)

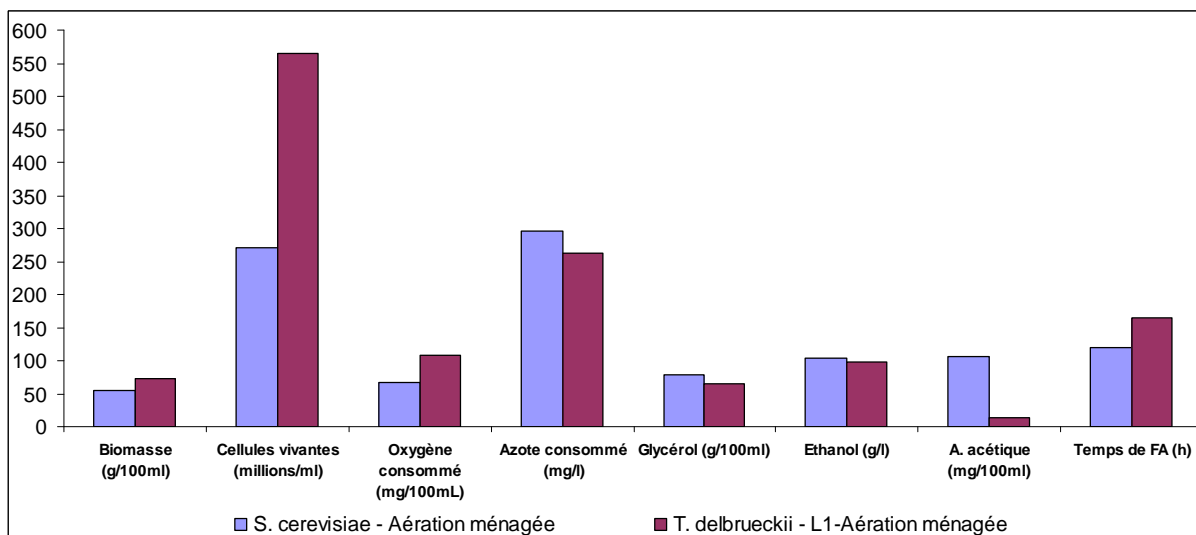


Figure III-2-10. Caractéristiques cinétiques et biochimiques des FA pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 1 dans la condition semi-anaérobie (A) et l'aération ménagée (B)

Ces résultats correspondent à ce qui est habituellement décrit dans la littérature comparant les deux espèces. Ainsi pour la durée de fermentation, le cas extrême est celui rapporté par Tataridis, (2001) pour lequel une souche de *S. cerevisiae* avait terminé la FA à 25 °C d'un moût de 182 g/L de sucre initial en 5 jours alors que sa souche de *T. delbrueckii* testée avait mis 30 jours. De même, Ciani et Maccarelli, (1998) ont constaté qu'en général les souches *T. delbrueckii* produisaient moins d'éthanol et de glycérol que les *S. cerevisiae*. Les premières produisaient en moyenne (pour 90 souches testées) 9,35 %v/v d'éthanol (minimum de 4 % et maximum de 12 %v/v) et 5,07 g/L de glycérol (minimum de 4,35 et maximum de 6,20 g/L),

tandis que les dernières en produisaient en moyenne (pour 50 souches testées) 14,90 %v/v d'éthanol (minimum de 12 % et maximum de 16 %v/v) et 7,38 g/L de glycérol (minimum de 6,53 g/L et maximum de 7,95 g/L). Ceci est confirmé avec nos souches pour le glycérol mais pas pour l'éthanol puisque notre souche de *T. delbrueckii* en a produit presque autant que la souche de *S. cerevisiae*.

III-2-3-2 Comparaisons des fermentations pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 1 et lot 2 dans la condition d'anaérobiose stricte

La Figure III-2-11 compare les caractéristiques des fermentations pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 1 et 2 dans la condition d'anaérobiose stricte. L'absence de l'oxygène dans le milieu de la FA anaérobiose stricte n'a pas permis à la *T. delbrueckii* lot 1 d'atteindre dans ce cas une quantité de cellules vivantes plus élevée que celle de *S. cerevisiae*. Par contre, pour le lot 2 la quantité de levures produites est bien supérieure à celle de *S. cerevisiae*. Cela peut être s'expliquer par la teneur en azote des levures sèches utilisées pour l'inoculation beaucoup plus importante dans le cas du lot 2. Les temps de fermentation ne sont pas du tout liés au nombre de cellules présentes. Ainsi pour le lot 2, la durée de fermentation est la plus longue alors que le nombre de cellule est le plus grand.

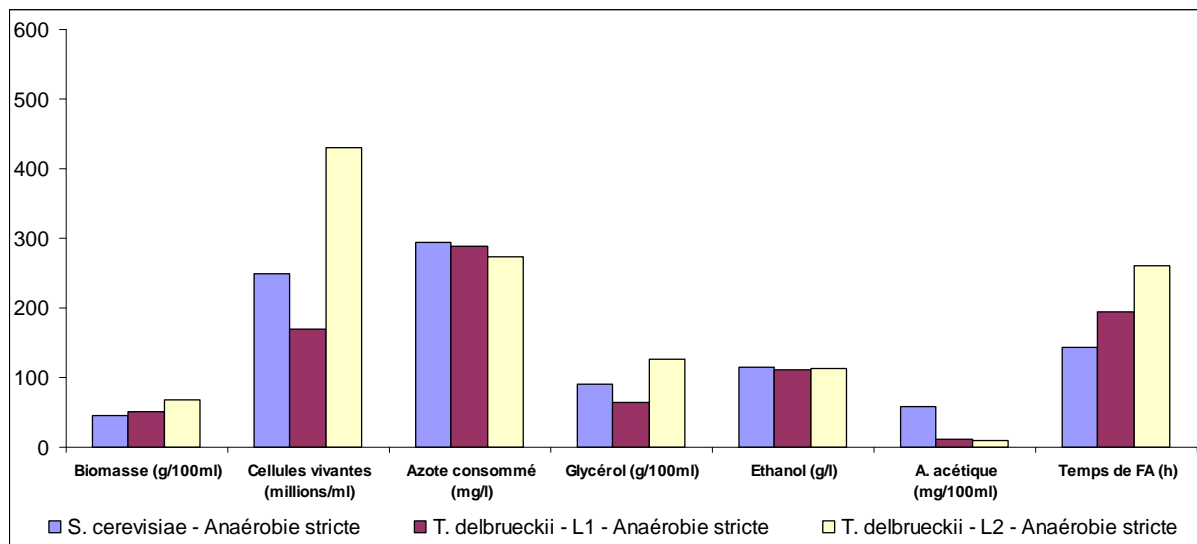


Figure III-2-11. Caractéristiques cinétiques et biochimiques des fermentations pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 1 et lot 2 dans la condition anaérobiose stricte

Pour *T. delbrueckii* lot 1 et lot 2 nous retrouvons une consommation d'azote et une production d'acide acétique moins importante que pour *S. cerevisiae*. Pour la production de glycérol, *S. cerevisiae* est intermédiaire entre les 2 lots de *T. delbrueckii*. Enfin l'éthanol produit est très comparable entre les 3 souches.

Récemment, Bely et al., (2008) ont trouvé que leurs souches testées de *T. delbrueckii* produisait moins d'acide acétique (0,43 à 0,62 g/L) que *S. cerevisiae* (1,17 g/L) en vinification de vin blanc. La production moindre d'acide acétique par *T. delbrueckii* par rapport à *S. cerevisiae* a aussi été constatée par plusieurs autres auteurs (Herraiz et al., 1990 ; Ciani et al., 1996). Afin de diminuer la concentration en acide acétique du vin ces auteurs ont donc proposé l'emploi de levains mixtes de *T. delbrueckii* avec *S. cerevisiae*.

Comparaison de la sensibilité à l'oxygène pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 1

Le Tableau III-2-5 illustre la sensibilité des souches aux différents apports d'oxygène. Le pourcentage de variation par rapport à la fermentation en anaérobie stricte des différents paramètres a été calculé pour l'aération ménagée et la semi-aérobie. Si les souches *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* réagissent qualitativement dans le même sens, quantitativement, la souche *T. delbrueckii* est beaucoup plus sensible, notamment au niveau de la production de biomasse et de glycérol. L'impact de l'oxygène sur la durée de la FA et sur la production d'éthanol est par contre comparable pour les deux levures.

Tableau III-2-5. % de variation des paramètres des FA semi-anaérobie et aération ménagée par rapport à la FA anaérobie stricte.

Paramètres	<i>S. cerevisiae</i> en condition		<i>T. delbrueckii</i> lot 1 en condition	
	Semi - Anaérobie	Aération ménagée	Semi - Anaérobie	Aération ménagée
Durée de la FA	-34,7 %	-16,7 %	-38,1 %	-15,0 %
Biomasse maximale	+ 46,7 %	+ 22,2 %	+ 86,3 %	+ 41,2 %
Concentration cellulaire maximale	+ 16,0 %	+ 8,0 %	+ 335,3 %	+ 232,3 %
Glycérol	-31,1 %	-13,3 %	-59,9 %	-0,6 %
Ethanol	-9,1 %	-10,2 %	-6,8 %	-11,1 %
Acide acétique	+ 208,6 %	+ 81,0 %	+ 1100 %	+ 27,3 %

En effet, par rapport à la biomasse produite en condition anaérobie, celle de *T. delbrueckii* augmente de 41,2 à 86,3 % en condition aération ménagée et semi-anaérobie tandis que celle de *S. cerevisiae* n'augmente que de 22,2 à 46,7 %. Ces écarts sont encore plus élevés quand on compare l'augmentation de la concentration cellulaire maximale entre ces deux levures. Mauricio et al., (1998) avaient observé le même phénomène. Ainsi, dans leur cas, l'addition d'ergostérol (25 mg/L) et d'acide oléique (31 mg/L) avait permis de récupérer totalement la

croissance cellulaire et l'activité fermentaire de *S. cerevisiae* en condition anaérobie par rapport à la semi-anaérobie alors que pour *T. delbrueckii* un ajout ponctuel d'oxygène était nécessaire pour récupérer totalement sa croissance cellulaire et son activité fermentaire. D'après Holm et al., (2001) et Nissen et al., (2004), ceci peut expliquer pourquoi *T. delbrueckii* est dominée par *S. cerevisiae* dans les conditions œnologiques proches de l'anaérobie.

Comparaison de la formation des esters pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* lot 2

La composition en esters du moût après fermentation a été déterminée uniquement pour les essais réalisés en anaérobie stricte avec les souches *T. delbrueckii* lot 2 et *S. cerevisiae*.

Les résultats présentés dans le Tableau III-2-6 montrent que la production des esters a été différente entre *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*.

Tableau III-2-6. Composition des esters dans les vins fermentés par *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* dans la condition anaérobie stricte

Concentration (mg/L)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>
Acétate d'éthyle	72	90
Butyrate d'éthyle	0,135	0,135
Acétate d'isoamyle	<0,05	0,96
Lactate d'éthyle	< 0,1	4,0
Caprylate d'éthyle	0,14	<0,05
Caprate d'éthyle	2,615	0,03
Hexanoate d'éthyle	0,05	<0,05
Succinate d'éthyle	< 0,1	0,2
Dodecanoate d'éthyle	< 0,1	< 0,1
Acétate d'hexyle	< 0,05	<0,05

T. delbrueckii a produit plus d'acétate d'éthyle, de lactate d'éthyle, d'acétate d'isoamyle et de succinate d'éthyle. Ces deux levures ont produit par contre la même concentration de butyrate d'éthyle. D'autre part, seul *S. cerevisiae* a synthétisé des esters d'acides gras comme le caprylate d'éthyle et le caprate d'éthyle.

Il est généralement considéré que les esters contribuent positivement à l'arôme fermentaire dans les vins (Rapp and Mandery, 1986). Les odeurs caractéristiques de fruit du vin sont principalement attribués au mélange des esters d'acétate, des esters d'éthyle dont le

caprylate d'éthyle donne l'odeur de pomme, l'acétate d'isoamyle donne l'odeur de banane et l'acétate de 2-phényléthyle donne l'arôme de miel et l'odeur des fleurs. L'acétate d'éthyle est l'ester le plus abondant du vin. Il peut avoir en œnologie, un impact négatif important car c'est cet ester, et non l'acide acétique, qui donne aux vins altérés le caractère d'acescence pour une concentration supérieure à 150 mg/L. Cependant, d'après Ribéreau-Gayon (1978), ce composé peut avoir des effets favorables sur l'arôme du vin pour une concentration autour de 80 mg/L.

D'après Van der Merwe et Van Wyk (1981), l'acétate d'isoamyle est un des esters les plus importants qui contribue au profil aromatique des vins par son odeur banane. Le seuil acceptable de ce composé est d'environ 5,3 mg/L. Il est très intéressant que dans notre étude, *T. delbrueckii* ait produit plus d'acétate d'isoamyle que *S. cerevisiae*. Au contraire, récemment, Renault et al., (2009) n'ont pas trouvé d'acétate d'isoamyle après la FA par une souche de *T. delbrueckii* dans un milieu synthétique à 240 g sucre/L. La production élevée d'acétate d'isoamyle nous permet de penser qu'il est possible d'améliorer la qualité des arômes des vins fermentés par *S. cerevisiae* en combinant sa présence avec celle de *T. delbrueckii*. Mauricio et al., (1993) ont prouvé que le caprylate d'éthyle, le caprate d'éthyle et l'acétate d'éthyle étaient produits à partir de l'éthanol et des acides correspondants. Dans notre étude, ces deux premiers esters ont été seulement produits par *S. cerevisiae*. Mauricio et al., (1998) avait de la même façon trouvé qu'en condition anaérobie *S. cerevisiae* produisait plus d'acides gras que *T. delbrueckii*. Dans la même tendance, Herraiz et al., (1990) ont montré que leur souche *S. cerevisiae* produisait plus d'acide caprique (4,21 mg/L) et caprylique (0,9 mg/L) que la souche *T. delbrueckii* (seulement, 0,75 mg/L et 0,16 mg/L).

Cependant il est à noter que notre étude sur le profil des esters produits par les 2 levures reste comparative car les conditions employées sont éloignées des conditions réelles œnologiques.

III-2-4 Conclusions

Les FA pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été réalisées dans 3 conditions d'aération différentes : semi-anaérobie, aération ménagée et anaérobie stricte. Les résultats principaux obtenus montrent que :

Dans toutes les conditions testées, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont terminé les fermentations. Cependant, également pour les 2 levures, la présence d'oxygène a favorisé la production de biomasse au détriment du glycérol tout en conservant des productions d'éthanol similaires. La biomasse étant plus importante, les durées des fermentations ont été plus courtes même si ces 2 facteurs ne sont pas proportionnels. Aucune différence notable d'effet de l'oxygène sur le métabolisme n'a été observée entre les deux souches. Par contre au niveau cinétique, il faut distinguer les 2 activités : en ce qui concerne la vitesse spécifique de croissance les 2 levures sont comparables ; en revanche *S. cerevisiae* est beaucoup plus performante pour la vitesse d'assimilation des sucres que *T. delbrueckii* malgré des quantités de biomasse formée bien moins importantes. On peut en conclure que *S. cerevisiae* possède une meilleure activité fermentaire que *T. delbrueckii*. Bien que notre souche semble performante par rapport à certaines données de la littérature en condition de co-cultures elle devrait probablement souffrir de la compétition avec *Saccharomyces* à cause de la différence de vitesse de fermentation des sucres.

Si qualitativement les deux levures ont été affectées de la même façon par les apports d'oxygène, quantitativement nous avons montré que *T. delbrueckii* était beaucoup plus sensible à ce paramètre que *S. cerevisiae*. Les variations des biomasses formées et la durée de fermentation qui en ont résultées ont été beaucoup plus importantes pour *T. delbrueckii*.

Une assez importante variabilité sur l'activité fermentaire et a été observée entre les deux lots de fabrication des souches *T. delbrueckii* sans qu'une véritable explication puisse être avancée en l'absence de donnée sur les conditions de fabrication des levures sèches en dehors de leur teneur en azote.

De plus, une réelle différence sur la production d'esters a été mise en évidence entre les *S. cerevisiae* et les *T. delbrueckii* justifiant l'emploi combiné de ces deux levures pour améliorer le profil aromatique des vins tout en conservant une activité fermentaire importante. L'intérêt est renforcé par la faible production d'acide acétique de la non *Saccharomyces*.

En condition réelle de vinification, en début de FA, le moût de raisin contient peu d'oxygène, de 5 à 7,5 mg/L à 20 °C – 25 °C. Cette quantité est rapidement consommée par les levures. Par la suite, la fermentation des sucres se fait dans des conditions proches de l'anaérobie en raison de la non homogénéisation du milieu et du dégagement important de CO₂ qui empêche le transfert d'oxygène. Cela est d'autant plus vrai en vinification en blanc pour laquelle l'utilisation de ces levains mixtes est notamment recommandée.

Nos résultats montrent qu'il est toutefois possible pour les deux souches de réaliser les FA en anaérobie dans des délais raisonnables. C'est pourquoi nous effectuerons par la suite les fermentations pour l'étude des interactions dans le bioréacteur en membrane sous azote sans aération, donc en anaérobie stricte. Les fermentations pures de *S. cerevisiae* et de *T. delbrueckii* lot 2 (le lot 1 étant épuisé) dans ces conditions serviront donc de témoin.

III-3 INTERACTIONS ENTRE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ET *TORULASPORA DELBRUECKII* PENDANT LA FERMENTATION DU VIN : INFLUENCE DE L'INOCULATION ET DE CONCENTRATION DE L'AZOTE ASSIMILABLE

Dans cette partie nous avons étudié le comportement des levures *Saccharomyces* et *Torulaspota* lorsqu'elles cohabitent au cours de la fermentation alcoolique. L'objectif était d'identifier tout d'abord l'existence ou non d'interactions et d'en déduire quelques enseignements pour la maîtrise et la conduite des FA co-inoculées avec ces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces* en vinification. L'influence de deux paramètres en particuliers a été étudiée : l'inoculation (moment et quantité) et concentration en azote du moût.

Les résultats sont présentés pour cette partie sous forme d'article.

Résumé

L'association d'une souche oenologique de *Torulaspota delbrueckii* et d'une souche oenologique de *Saccharomyces cerevisiae* pour la réalisation de FA de jus de raisins a été étudiée. Les expériences ont été réalisées sur du moût synthétique de jus de raisins blancs dans des bioréacteurs en membranes, outils spécifiques pour l'étude d'interactions entre micro-organismes. Les résultats montrent que cette souche de *S. cerevisiae* a un impact négatif sur cette souche de *T. delbrueckii* entraînant une chute importante de viabilité de cette dernière dès l'inoculation de la première. Même pour des niveaux d'inoculation bas de *S. cerevisiae* (0.5 million cell./ml contre 10 millions cell./ml pour *T. delbrueckii*), la croissance de *T. delbrueckii* est inhibée. Par ailleurs, dans un milieu avec une teneur initiale importante en azote assimilable (324 mgL⁻¹), la croissance de *S. cerevisiae* n'est pas affectée par *T. delbrueckii*. En conséquence, pour assurer le développement de *T. delbrueckii* et lui permettre d'exprimer son potentiel aromatique, *S. cerevisiae* doit être inoculée 48h après l'inoculation de *T. delbrueckii*.

De plus, lors d'une fermentation séquentielle dans un milieu contenant seulement 176 mg/l d'azote assimilable, *S. cerevisiae* n'a pas été capable de se développer en raison de l'épuisement de l'azote du à la croissance de *T. delbrueckii* durant les 48 premières heures de fermentation, entraînant un arrêt de fermentation.

Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content

Patricia Taillandier**, Quoc Phong Lai, Anne Julien-Ortiz* and Cédric Brandam

Université de Toulouse, INP-ENSIACET, Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503, 4, allée Emile Monso – BP 44362 – 31030 Toulouse, FRANCE.

*Lallemand S.A.S., 19, rue des Briquetiers BP 59 31702 Blagnac Cedex, FRANCE.

** Corresponding author. Tel.: 33 (0)5 32 33 36 18 and Fax: 33 (05) 34 32 33 98.

E-mail address: patricia.taillandier@ensiacet.fr (P. Taillandier)

Running title: Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

In order to improve the aromatic profile of wine, the alcoholic fermentation by an oenological strain of *Torulaspora delbrueckii* in association with an oenological strain of *Saccharomyces cerevisiae* has been studied in mixed and sequential cultures. Experiments were performed in grape must synthetic media with a membrane bioreactor, a special tool conceived to study interactions between microorganisms. Results showed that this *S.cerevisiae* strain had a negative impact on this *T.delbrueckii* strain, leading to a viability decrease as soon as *S.cerevisiae* was inoculated. Even for a low inoculation rate of *S.cerevisiae* in mixed cultures (0.5 million cells/ml against 10 million cells/ml for *T. delbrueckii*), *T.delbrueckii* growth was inhibited. On the other hand, in medium with a high concentration of assimilable nitrogen (324 mgL⁻¹), *S.cerevisiae* growth was not affected by *T.delbrueckii*. Consequently, in order to ensure the growth of *T.delbrueckii* and allow it to express its aromatic potential, *S. cerevisiae* must be inoculated 48h after *T.delbrueckii* inoculation. Nevertheless these esters profile in wine is modified by the use of *T.delbrueckii*, but to a different extent. Moreover, in a sequential fermentation in a medium containing only 176 mg/l initial assimilable nitrogen, *S.cerevisiae* was not able to develop because of nitrogen exhaustion by *T.delbrueckii* growth during the first 48h, leading to sluggish fermentation.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, yeast interactions, wine fermentations, wine esters.

III-3-1 Introduction

Traditional wine fermentation is a complex microbial process performed by different yeast species. In the grape must, at the beginning of the fermentation, many indigenous species are present. Usually, species of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* are distinguished. More specifically, in indigenous alcoholic fermentation (AF), the presence of the following non-*Saccharomyces* yeasts can be found: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Pichia* and *Metschnikowia* (Fleet and Heard 1993a and Ocón et al. 2010), *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulaspora* (Lema et al. 1996, Ciani et al. 2002, Xufre et al. 2006, Renouf et al. 2006). Generally, non-*Saccharomyces* are considered active in the first part of the fermentation, when ethanol concentration is not too high. But, compared to *Saccharomyces* species, they are not well adapted to finishing the alcoholic fermentation (AF), and are rapidly replaced by these more ethanol tolerant yeasts.

As a consequence of the action of these various indigenous yeast species during the spontaneous AF, different flavours can be obtained in wines. However, due to the unpredicted interspecies interactions between different yeasts, it is difficult to have a good control of the final product with a constant quality. To remedy this problem, modern wine AF is generally carried out by massive inoculation of commercial yeast *S. cerevisiae*, which prevents the other microorganism developments and then assures the stabilisation of wine quality. Nevertheless, today, to obtain wines with more complexity or different aromas, inoculations with non-*Saccharomyces* are performed in association with *Saccharomyces* (Ciani et al. 2006 and Bely et al. 2008). The difficulty for the winemakers is to manage these multistarter fermentations. They must determine the quantities and timing of inoculation for each species, in order to optimize the organoleptic characteristics of wines whilst preserving good efficiency of the AF, i.e. a rapid and total consumption of sugars.

Torulaspora delbrueckii (formerly named *S. rosei*) is one of the non-*Saccharomyces* species that can be found in indigenous fermentation (Moreno et al. 1991 and Xufre et al. 2006). This species has many good oenological characteristics, such as a high level of ethanol and glycerol production (Herraiz et al., 1990, Bely et al. 2008), low formation of acetaldehyde, acetoin and volatile acids and good production of higher alcohols and fruity esters (Ciani et al 1998, Ciani et al 2006 and Renault et al 2009). In consequence, some authors suggested using simultaneously *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* in order to improve the fruity aroma quality and reduce the acetic acid concentration of wines (Bely et al 2008). Nevertheless, in simultaneous inoculation, *S. cerevisiae* develops faster and the non-*Saccharomyces* cannot reveal its aroma potential (Nissen et al 2003, Farkas et al 2005). Other authors proposed using these two species sequentially: first, inoculating only *T. delbrueckii*, so that they produce higher alcohols and fruity esters, and then introducing *S. cerevisiae* to finish the conversion of sugars into alcohol (Herraiz et al 1990, Ciani et al 2006 and Pillet et al 2010).

The objective of this work was to acquire a better knowledge on these yeast interactions, in order to better manage the multistarter fermentation. Experiments were carried out with enological yeast strains of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* in a grape must synthetic medium. Fermentations with sequential inoculation (first *T. delbrueckii*, then *S. cerevisiae*) were compared with simultaneous inoculation and pure fermentations with each strain. The influence of initial nitrogen content in the medium was also studied.

II-3-2 Materials and Methods

Yeasts

The enological yeasts *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* were supplied by Lallemand S.A., France as active dry yeasts.

Medium

Synthetic media used in this work were proposed by Salmon and al. (1998). The composition is close to white grape must: glucose (110 g.L⁻¹), fructose (110 g.L⁻¹), malic acid (6 g.L⁻¹), citric acid (6 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0.75 g.L⁻¹), K₂SO₄ (0.5 g.L⁻¹), MgSO₄, 7 H₂O (0.25 g.L⁻¹), CaCl₂, 2H₂O (0.16 g.L⁻¹), NaCl (0.2 g.L⁻¹), 1 mL of anaerobia factors stock solution, 1 mL of oligo elements stock solution and 10 mL of vitamins stock solution. The composition of the stocks solutions used to prepare fermentation medium was:

- solution of oligoelements (g/L): MnSO₄.H₂O 4, ZnSO₄.7H₂O 4, CuSO₄.5H₂O 1, KI 1, CoCl₂.6 H₂O 0.4, H₃BO₃ 1, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 1
- solution of amino acids (g/L): Tyrosine 1.4, tryptophan 13.7, isoleucine 2.5, aspartic acid 3.4, glutamic acid 9.2, arginine 28.6, leucine 3.7, threonine 5.8, glycine 1.4, glutamine 38.6, alanine 11.1, valine 3.4, methionine 2.4, phenylalanine 2.9, serine 6.0, histidine 2.5, lysine 1.3, cysteine 1.0, proline 46.8
- solution of vitamins (g/L): Myo-Inositol 2, Calcium pantothenate 0.15, hydrochloride thiamin 0.025, nicotinic acid 0.2, pyridoxine 0.025, biotin 3 ml
- solution of anaerobic factors (g/100mL): ergosterol 1.5, Oleic acid 0.5 mL, Tween 80 50 mL, absolute ethanol 50mL.

The nitrogen source was ammonium ions brought by NH₄Cl and amino acids stock solution. Three different concentrations in nitrogen source were used. The medium named MS300 contained an equivalent of 324 mg N.L⁻¹ that could be assimilable by yeasts (204 mg N.L⁻¹ from amino acids solution corresponding to 13.04 mL.L⁻¹ of amino acids solution and 120 mg N.L⁻¹ from NH₄Cl corresponding to 0.46 g.L⁻¹). Medium MS170 contained only 176 mg N.L⁻¹ of assimilable nitrogen (108 mg N.L⁻¹ from amino acids solution corresponding to

7.4 mL.L⁻¹ and 68 mg N.L⁻¹ from NH₄Cl corresponding to 0.26 g.L⁻¹). Proline present in the amino acids solution was considered not to have been metabolised by *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*, and so is not included in the assimilable nitrogen concentration. The pH of media was adjusted to 3.3 with a sodium hydroxide solution (10N) before autoclaving 20 min at 120°C.

Membrane bioreactor

A tool designed specially to study the indirect interactions between two microorganisms was used: a two-compartment membrane homemade bioreactor (MBR). It is composed of two jars interconnected by a hollow fibre membrane module system immersed in one of the jars which allows only the medium but not the microorganisms to pass through. Each strain is only inoculated in one compartment which can be sampled and analysed distinctly. By alternatively applying pressure into the headspace of each of the vessels, the medium flow and mixing are carried out. Compressed and filter-sterilised nitrogen is used for applying pressure and a system of valves controls its admission and expulsion according to the liquid levels, which are measured with conductivity probes. Time and quantity of liquid inversion have been calculated to ensure a perfect homogenisation between the two jars. Hence, the growth of each microorganism occurs as if they were grown in the same vessel. The complete system is described in more detail by Salgado et al (2000) and Albasi et al (2002).

Fermentations

Three types of inoculations were performed: inoculation of only one strain (named pure fermentation), simultaneous inoculation of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* (named mixed fermentation) and inoculation of *T. delbrueckii* followed 48h after by the inoculation of *S. cerevisiae* (named sequential fermentation). For all fermentations with *T. delbrueckii*, its inoculation level was 10x10⁶ viable cells/mL. For mixed and sequential fermentation, *S. cerevisiae* was inoculated at 5x10⁶ viable cells/mL giving a ratio *T. delbrueckii* on *S. cerevisiae* of 2 named low ratio, (T/S)L. Pure fermentation of *S. cerevisiae* was performed with this same inoculation. In the sequential fermentation industrial case, when *T. delbrueckii* is first inoculated at the beginning, the grape must is not sterile and other microorganisms, particularly *S. cerevisiae*, are present. To evaluate the development of *T. delbrueckii* in the presence of *S. cerevisiae* indigenous flora in grape must, an experiment was performed with a simultaneous inoculation of 10x10⁶ viable cells/mL of *T. delbrueckii* and 0.5x10⁶ viable cells/ml of *S. cerevisiae*. In this case, the ratio *T. delbrueckii* on *S. cerevisiae* was of 20 named high ratio, (T/S)H.

For all fermentations, the temperature was 20°C and a magnetic bar (250 rpm) provided the homogenization of the medium in each vessel. The samples of the fermentations were taken timely during the courses of fermentations and centrifuged at 11.500 rpm, at 0°C, for 15 min and finally stocked in the freezer at -20°C, before being used for composition analyses. The AF was considered to have finished when 97% of its initial sugar was consumed.

Chemical analyses

The total sugars were determined by using α dinitrosalysilic reagent described by Miller G. L. (1959), with a maximum experimental error of 4%. The total assimilable nitrogen was defined as the sum of the ammonium and L- α amino acid nitrogen contents analysed by two enzymatic methods: Microdom kit no 110 05 037 00 for NH_4^+ measurement, and Microdom kit no 110 10 11000 for L- α amino nitrogen measurement, with an experimental error lower than 5% in both methods. The ethanol and glycerol concentrations were analysed by an HPLC-equipped BioRad Aminex HXP-87H column. The liquid phase was 5 mmol of sulfuric acid solution and circulated at 0.4 mL/min at 40°C. The volume of the injection loop was 20 μl . The peaks of ethanol and glycerol were detected by a refractometer. The experimental error was less than 5%. The ester compounds were analysed by Gas Chromatography coupled with FID by Lallemand S.A. The coefficient deviation of the ester concentration was at a maximum of 6.5 %.

Microorganism analyses

The number of cell concentrations was determined using Thoma hemacytometer. The percentage of viable cells was obtained using the methylene blue staining method, with an error of 8%.

Mathematical processing of data

The kinetics of the fermentation, such as sugar consumption and viable cell growth, were smoothed by a cubic spline function using a Microsofts Excel™ macro.

III-3-3 Results

III-3-3-1 Pure fermentations of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*

In this study, the pure cultures of *Torulaspora* and *Saccharomyces* were carried out in duplicate in MS300 medium.

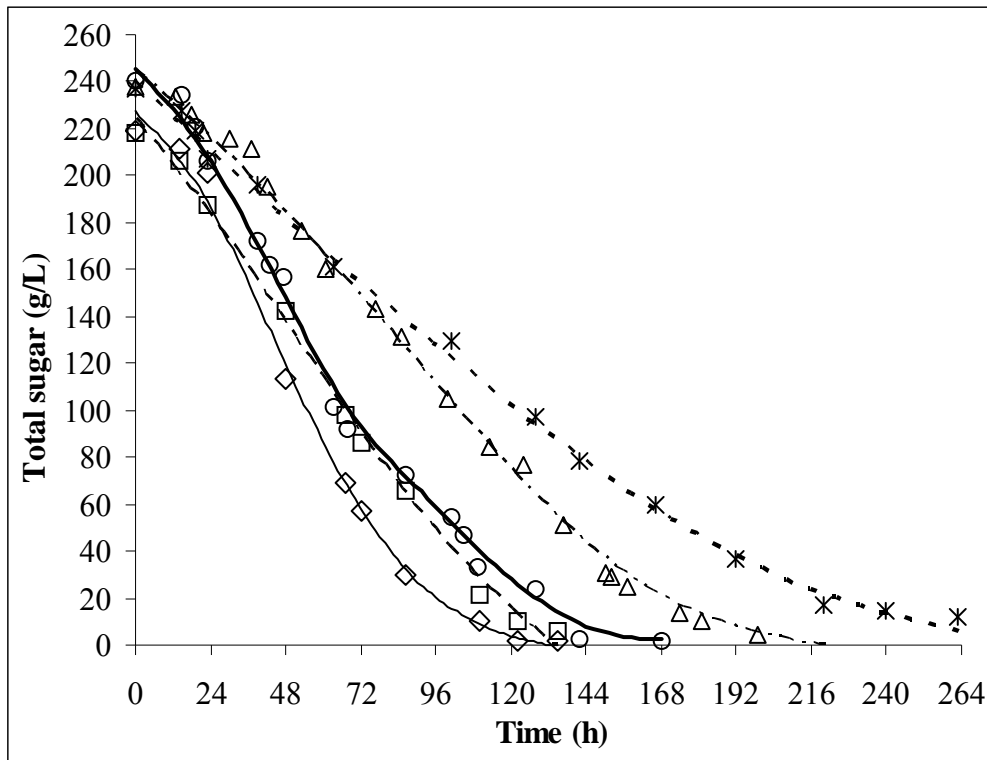


Figure III-3-5. Fermentation kinetics of pure, mixed and sequential cultures of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* in MS300.

Where: S for pure *S. cerevisiae* fermentation; T_p for pure *T. delbrueckii* fermentation; (T+Ss) for sequential fermentation; (T/S)L for mixed fermentation with low ratio of T/S and (T/S)H for mixed fermentation with high ratio of T/S and flash arrow for the moment of inoculation of *S. cerevisiae* in the sequential fermentation.

The kinetics of total sugar consumption presented in figure III-3-1 show that the two yeasts finished their fermentation well since the final concentrations were under 97% of the initial sugars (criterion for stopping the experiment). Nevertheless, *S. cerevisiae* presented a better speed of fermentation since it needed only 145h (6 days) compared to 258h (11 days) for *T. delbrueckii*. The kinetics of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* viable cells are presented in figures III-3-2a and III-3-2b respectively. The two yeasts had no lag phase and reached the stationary phase after 2 days of fermentation. *S. cerevisiae* attained only 300×10^6 viable cell/mL against 430×10^6 viable cell/mL for *T. delbrueckii* (table III-3-1). The viability remained constant around 90% for the two yeasts during the fermentation (data not showed). Ethanol production was approximately identical between the two yeasts with an ethanol yield of 0.48 and 0.49 g/g of sugars for *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* respectively (table III-3-2). So, this strain of *S. cerevisiae* was more efficient for AF than the strain of *T. delbrueckii* since it produced the same quantity of products in a shorter time.

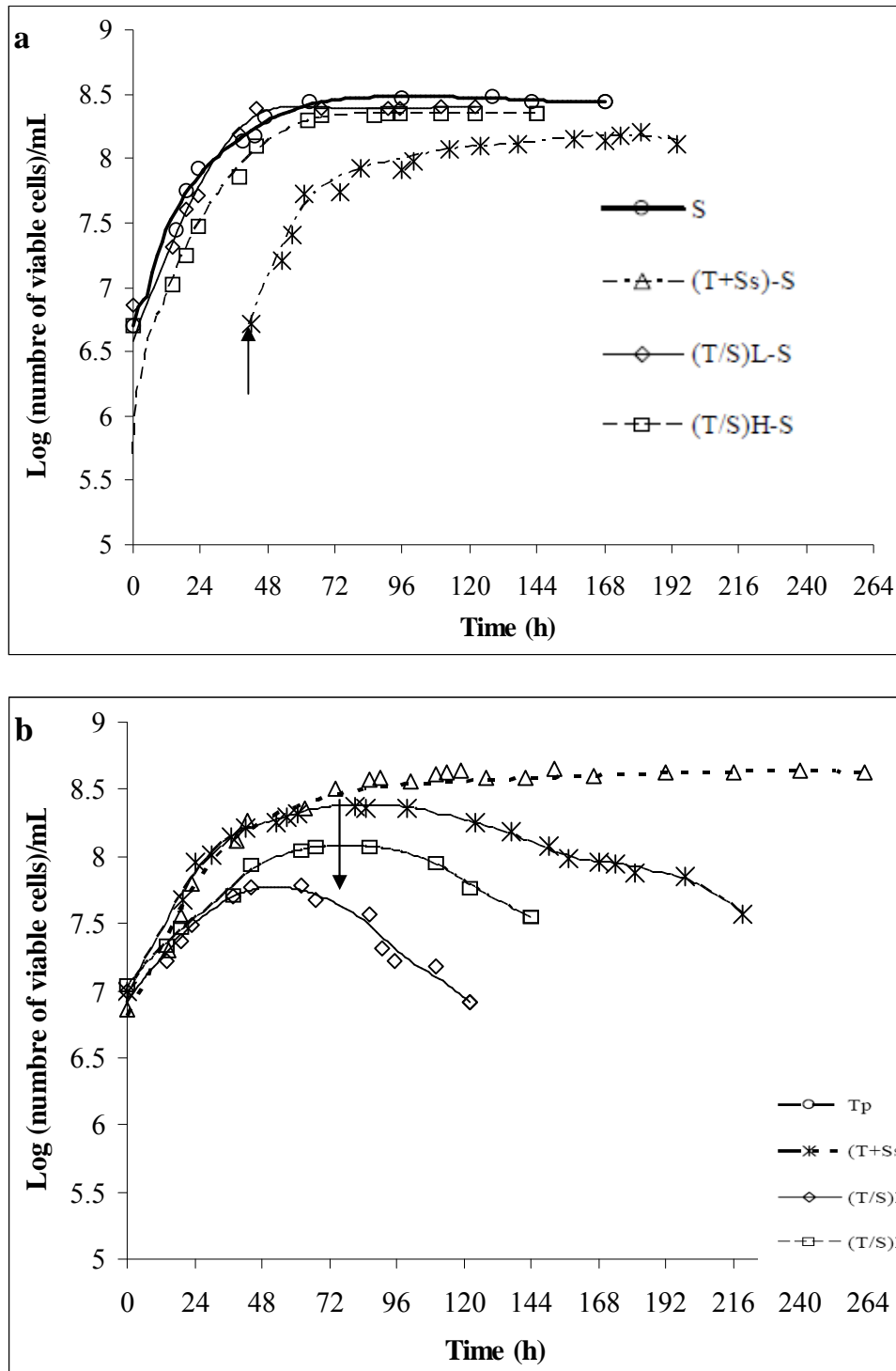


Figure III-3-6. Cell growth kinetics of *S. cerevisiae* (a) and *T. delbrueckii* (b) in their pure, mixed and sequential cultures.

Where: S for *S. cerevisiae* in the pure fermentation; (T+Ss)-S for *S. cerevisiae* in the sequential fermentation; (T+Ss)-T for *T. delbrueckii* in the sequential fermentation; (T/S)L-S for *S. cerevisiae* in the mixed fermentation with low ratio of T/S and (T/S)H-S for *S. cerevisiae* in mixed fermentation with high ratio of T/S; (T/S)L-T for *T. delbrueckii* in the mixed fermentation with low ratio of T/S and (T/S)H-T for *T. delbrueckii* in mixed fermentation with

high ratio of T/S and flash arrow for the moment of inoculation of *S. cerevisiae* in the sequential fermentation.

Table III-3-1: Major Constituents of wines from pure, mixed and sequential

Fermentation	[S] _{initial} (g/L)	Ethanol (g/L)	Maximun viable cells (10 ⁶ /ml) of <i>T.</i> <i>delbrueckii</i>	Maximun viable cells (10 ⁶ /ml) of <i>S. cerevisiae</i>	Consumed assimilable nitrogen (mg/L)	Time of fermen- tation (h) ^a
<i>S. cerevisiae</i> in MS300	245	115		300	319.5	145
<i>T. delbrueckii</i> in MS300	240	114	430		296.1	258
Sequential in MS300	245	107.5	240	150	311.8	192
Mixed with low ratio, (T/S)L	227	102.1	59	255	315.1	114
Mixed with high ratio, (T/S)H	224	106.6	119	226	317.2	128
<i>T. delbrueckii</i> in MS170	247	111.4	300		165.6	295
Sequential in MS170	223	101.9	115	23	161.1	402

a: time to consume 97% of initial sugar in AF

Table III-3-2: Principal characteristics of all fermentations

Fermentation	Medium	Yield of ethanol (g/g)	Ethanol productivity (g/L/h)	Sugar consumption rate (g/L/h)
Pure <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	MS300	0.48	0.80	1.65
Pure <i>T.</i> <i>delbrueckii</i>	MS300	0.49	0.44	0.89
Sequential	MS300	0.45	0.56	1.23
Mixed with low ratio, (T/S)L	MS300	0.46	0.90	1.93
Mixed with high ratio, (T/S)H	MS300	0.49	0.83	1.70
Pure <i>T.</i> <i>delbrueckii</i>	MS170	0.46	0.38	0.81
MS170-T+Ss	MS170	0.47	0.25	0.52

Concerning ester production, table III-3-3 shows that *T. delbrueckii*, compared to *S. cerevisiae*, produced more ethyl acetate, ethyl lactate, isoamyl acetate and diethyl succinate but less ethyl octanoate, ethyl decanoate and ethyl hexanoate.

Table III-3-3: Ester composition in fermented wines from pure, mixed and sequential fermentations in MS300

Final concentration (mg/L)	Pure culture of <i>S. cerevisiae</i>	Pure culture of <i>T. delbrueckii</i>	Sequential fermentation T+Ss	Mixed fermentation with low ratio (T/S)L	Mixed fermentation with high ratio (T/S)H
Ethyl acetate	72	90	52.8	74	74.5
Ethyl butyrate	0.135	0.135	0.11	0.08	0.10
Isoamyl acetate	<0.05	0.96	0.5	0.26	0.16
Ethyl lactate	< 0.1	4.0	3.35	4.0	5.3
Ethyl octanoate (caprylate)	0.14	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Ethyl decanoate (caprate)	2.615	0.03	0.055	0.035	0.02
Ethyl hexanoate	0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Diethyl succinate	< 0.1	0.2	< 0.1	< 0.1	< 0.1

III-3-3-2 Comparison of mixed and sequential fermentations with low ratio T/S

The membrane bioreactor does not allow the study of direct interactions between yeasts, since they grow in separately vessels. To verify that no interaction existed between the tested strains, an experiment was carried out in MBR with inoculation of *T.delbrueckii* and *S. cerevisiae* in the same vessel. The results obtained (data not showed) in terms of the sugar consumption kinetics, ethanol production and total biomass growth were exactly the same as in experiments performed with inoculation of strains in separated vessels. So, the hypothesis of the existence of direct interactions between these two strains can be excluded.

On one hand the growth kinetics and the number of viable cells of *S. cerevisiae* reached on the stationary phase (figure III-3-2a) were approximately the same for pure (300×10^6 viable cells/mL) and mixed fermentations (255×10^6 viable cells/mL). In sequential fermentation, the growth kinetics were the same with a 48h delay due to the delay of inoculation, but the cell concentration attained was lower (150×10^6 viable cells/mL).

On the other hand, the concentration of viable cells of *T. delbrueckii* was more affected by

the presence of *Saccharomyces* (figure III-3-2b). In sequential fermentation, when *S.cerevisiae* was inoculated after 48h, the viability of *T.delbrueckii* decreased rapidly. After reaching 430.10^6 viable cells/mL at the beginning of the stationary phase as in its pure culture, the viable cells regularly decreased to be only of 50.10^6 viable cells/mL at the end of AF. In mixed fermentation, the growth of *T.delbrueckii* was inhibited by the presence of *S. cerevisiae* since the maximum population was of 60.10^6 viable cells/mL obtained after 70h and a decrease of the viability was then also observed.

The duration of the mixed AF (114h) was shorter than that of the pure *S.cerevisiae* fermentation (145 h) since the *S. cerevisiae* concentration was the same as in the pure fermentation but with the action of *T.delbrueckii* in addition. The length of the sequential fermentation (192h) was between the two pure fermentations (between 145 h and 258 h) since the action of *T.delbrueckii* was the same during the first 48h, but the alcoholic fermentation was then accelerated by the growth of inoculated *S. cerevisiae*. So, the time for reaching 97% sugar consumption in figure 1 was coherent with the observed populations.

Ester composition obtained at the end of AF was different between the two experiments. Isoamyl acetate and ethyl decanoate (caprate) concentrations were higher in sequential fermentation where *T.delbrueckii* grew before *Saccharomyces* inoculation compared to the mixed fermentation whereas ethyl acetate and ethyl lactate concentrations were less significant.

III-3-3-3 Implantation of *T.Delbrueckii* in grape must containing indigenous *S. cerevisiae*

To simulate the inoculation of *T. delbrueckii* in a real case where the grape must is not sterile, an experiment was carried out with a high inoculation ratio (20:1) of *Torulaspora/Saccharomyces*. The initial *Saccharomyces* population of only 0.5×10^6 viable cells/mL represented the indigenous microorganism presence that can be found in natural grape must. Results on fermentation kinetics and population growths are presented in figures III-3-1 and III-3-2. They show slight differences with the experiment with low ratio *Torulaspora/Saccharomyces* of 2:1. Sugar consumption occurred in 128 h compared to 114 h for the low ratio, and the ethanol production, ester composition and *Saccharomyces* population were very close between the two experiments (table III-3-2 and III-3-3). Only the *Torulaspora* population was less significant since the maximum viable population attained 59 million cells/ml for the low ratio compared to 119 million cells/ml for high ratio experiments. Moreover, the viability of *Torulaspora* fell rapidly to attain only 10% in the end of the AF. So, even with a high inoculation ratio of *Torulaspora* on *Saccharomyces*, the *Torulaspora* growth was weak compared to pure culture.

III-3-3-4 Influence of nitrogen content of the grape must on sequential fermentation

In sequential fermentation, *Saccharomyces* growth was less significant than in pure *Saccharomyces* fermentation. A hypothesis is that when *Saccharomyces* was inoculated 48h after *Torulasporea*, the nitrogen content of the must was deficient for the normal growth of the *Saccharomyces*. Evolutions of assimilable nitrogen contents for the experiment carried out on the MS300 medium are presented in figure III-3-3. For experiments with the two populations, nitrogen was totally exhausted as for the pure *Saccharomyces* culture. For the pure *Torulasporea* culture, nitrogen was not totally exhausted since there was 25 mg/L left at the end of the AF. So *Saccharomyces* consumed more nitrogen than *Torulasporea*. In all cases, the nitrogen consumption took place only during the growth of the microorganisms.

The fermentation which occurred with pure *Torulasporea* in MS170 was 37h longer than pure *Torulasporea* in MS300. It seems logical since the maximum population attained was only of 300 million cells/ml against 430 million cells/ml for the MS300. It can be supposed that the nitrogen content in MS170 was insufficient to reach the population obtained in MS300 (table III-3-2).

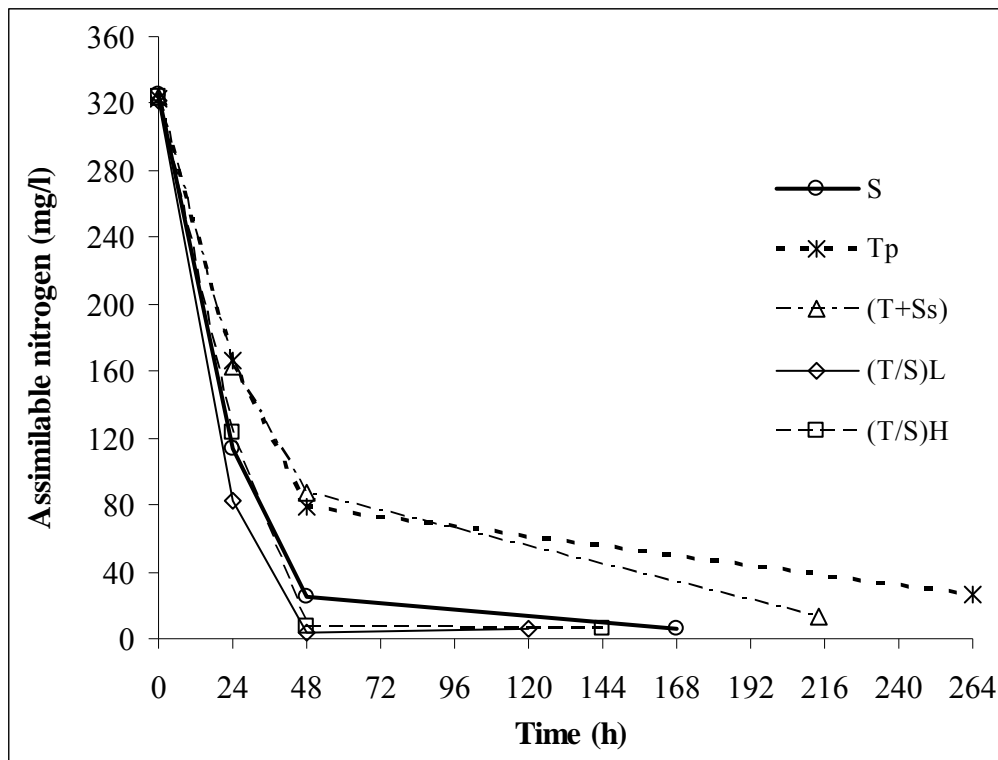


Figure III-3-7: Kinetics of assimilable nitrogen consumption in the fermentations.

Where: flash arrow for the moment of inoculation of *S. cerevisiae* in the sequential fermentation., S for pure *S. cerevisiae* fermentation; Tp for pure *T. delbrueckii* fermentation; (T+Ss) for sequential fermentation; (T/S)L for mixed fermentation with low ratio of T/S and (T/S)H for mixed fermentation with high ratio of T/S.

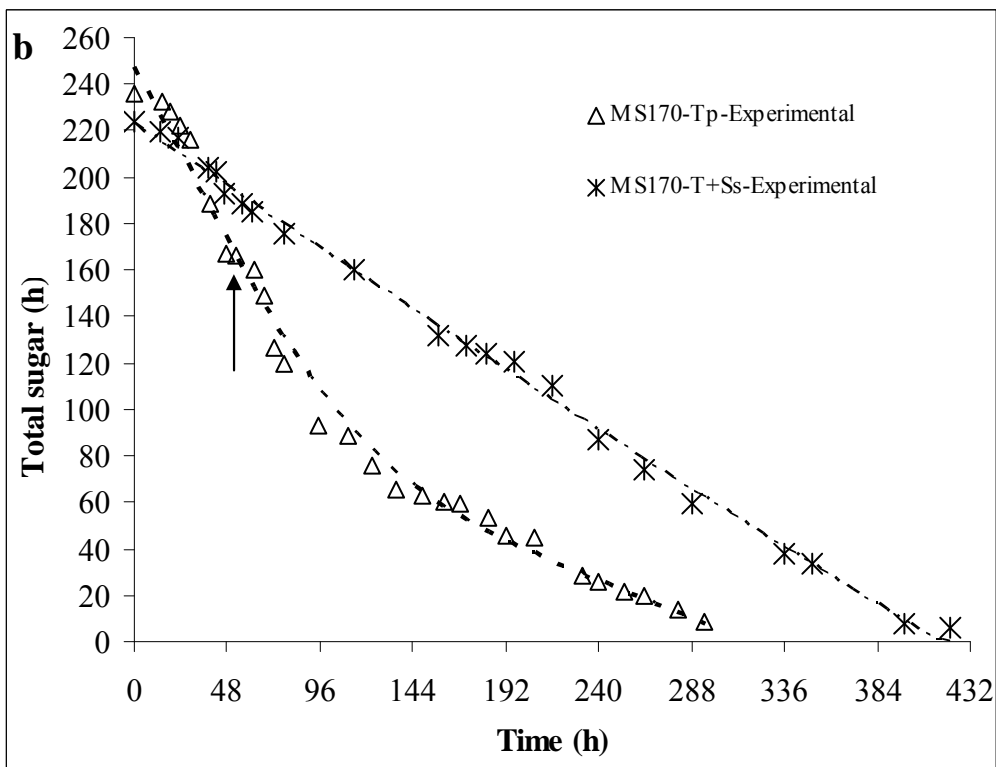
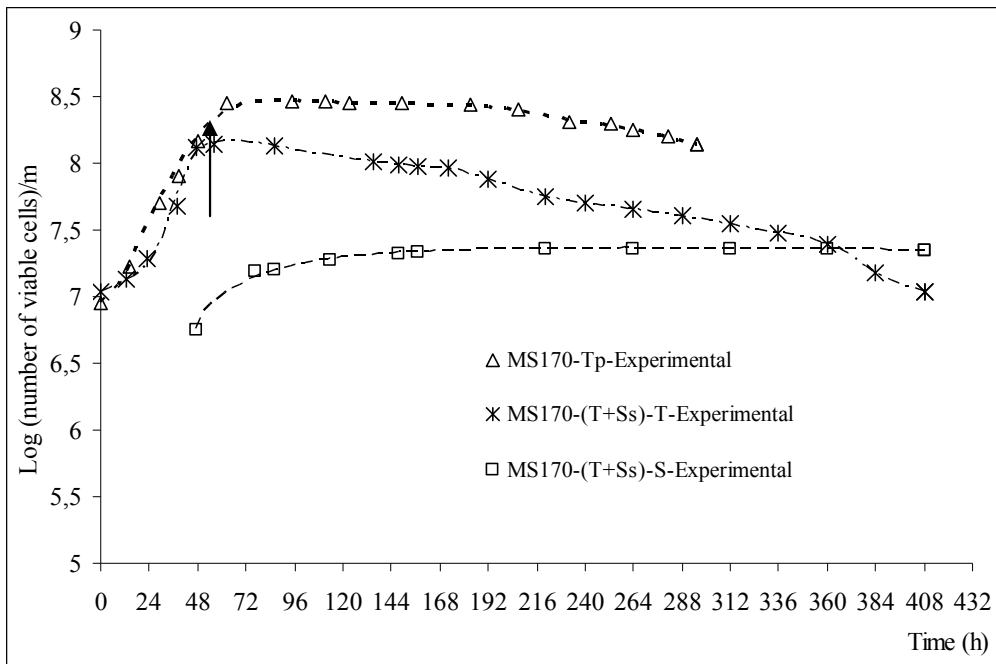


Figure III-3-8. Viable cell growths (a) and sugars consumption (b) of pure and sequential cultures *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* in MS170.

Where: MS170- T_p for *T. delbrueckii* in the pure fermentation in MS170; MS170-(T+Ss)-T for *T. delbrueckii* in the sequential fermentation in MS170 and MS170-(T+Ss)-S for *S. cerevisiae* in the sequential fermentation in MS170 and flash arrow for the moment of inoculation of *S. cerevisiae* in the sequential fermentation.

In sequential inoculation in MS170 experiments, *Saccharomyces* attained only 23 million cells/ml. For *Torulaspora*, the first 48h was identical for its growth between pure *Torulaspora* fermentation and sequential fermentation. However, when *Saccharomyces* was inoculated, even its growth was very small, the viability of *Torulaspora* fell from 115 million cells/ml to 15 million cells/ml after 400h. Consequently, the AF time was longer than with pure *Torulaspora* in MS170, since it only finished after 400h (figure III-3-4).

III-3-4 Discussion

In our study, *Torulaspora* could bring the fermentation to an end with 240 g/L of initial sugar, 11 days after its inoculation in the grape must synthetic medium MS300 and 12 days after in MS170 (table III-3-1). This strain showed good ethanol tolerance as a non-*Saccharomyces* starter species, unlike reports in literature for other *Torulaspora* strains. For example with similar initial sugar concentrations Ciani et al (2006) at the same temperature and Plata et al (2003) found incomplete fermentation on grape must: about 50% of residual sugar. In a comparison of 21 strains, Renault et al. (2009) found that none of them were able to exhaust 240 g/l of sugars in similar conditions.

In MS300, the consumed assimilable nitrogen in the pure cultures was higher for *Saccharomyces* compared to *Torulaspora* especially during the growth phase. This observation had also been reported by Bely et al (2008). After 48 hours of *Torulaspora* fermentation, only 80 mg/l of assimilable nitrogen remained in the medium that can explain a decrease of 50% in final biomass reached by *Saccharomyces* in sequential fermentation compared to its pure culture. Nevertheless the fermentation duration (table 2) was acceptable for the sequential fermentation.

In mixed cultures, due to its higher fermentation rate, *Saccharomyces* could develop rather as well that in its pure culture giving similar kinetics whatever the inoculation ratio whereas *Torulaspora* growth was restricted of a factor 4 to 8 respectively for high and low ratio of the non *Saccharomyces*. After 24 hours, *Saccharomyces* became the dominant strain in both cases. The difference of fermentation rate is so one of the reason for the antagonism against *T. delbrueckii*. Similar results have been observed by Farkas et al (2005) in synthetic malt wort. This can explain that the kinetics of mixed cultures were similar to the one of pure *Saccharomyces* whatever the inoculation ratio and even a little shorter due to the additional biomass of *Torulaspora*.

In high sugar fermentation Bely et al (2008) recommended mixed cultures at a ratio T/S of 20:1 rather than sequential one. Other authors showed small differences in mixed and sequential cultures but in their case the conditions were different: ratio 1:1 in mixed fermentation and early inoculation of *Saccharomyces* in sequential fermentation (Ciani et al., 2006).

In medium with reduced nitrogen content, MS170 fermentation rate of *Torulaspota* in pure culture was reduced of 10% compared to MS300 due to a lower viable biomass present during the stationary phase although the rate growth was similar during the 48 first hours. The sequential fermentation was highly affected and twice longer than the one in MS300. This rate decrease can be explained by the weak growth of *Saccharomyces* compared to pure culture since only 23 million cells were produced. Indeed the inoculation of *Saccharomyces* took place after 48 hours and the assimilable nitrogen was probably exhausted. An other reason of the longer time fermentation in MS170 was that the viability of *Torulaspora* strongly decreased in the stationary phase of the mixed culture.

There were no significant different ethanol productions between the pure and sequential AF of *Torulaspota* in MS300 and MS170 (table III-3-2). In MS300 the sequential fermented wine had the same glycerol concentration as the pure one of *Saccharomyces* (9 g/L), (data not shown). *Torulaspota* produced more isoamyl acetate (isopentyl acetate, banana, pear-drops aromas), and ethyl lactate (strawberry), as well as diethyle succinate (fruity) than *Saccharomyces* and only produced ethyl decanoate as a fatty acid ester in significant amounts. *Torulaspota* has already been described as yeast which produces very small amounts of ethyl hexanoate and octanoate (Renault et al. 2009). In sequential cultures, isoamyl acetate and ethyl acetate were increased compared to *Saccharomyces* fermentation, whereas all esters of fatty acids were reduced. In mixed cultures, despite the low presence of *Torulaspota*, the same compounds were affected, but isoamyl acetate production seemed to be proportional to the presence of *Torulaspota*. Isoamyl acetate concentration in the sequential trial was 2 to 3 times higher than that of the mixed ones. More isoamyl acetate production in co-inoculation of *Saccharomyces* with a non-*Saccharomyces* in wine fermentations was previously showed by Moreno et al. (1991), Rojas et al. (2001) and Moreira et al. (2008). Ethyl acetate is known as the second most important volatile component (after acetic acid). Concentrations below 70 mg/L are considered positive for the wine aroma (Rapp 1993), but over 150 mg/L, it can create negative aromas, such as like-solvent (Jackson 1994). In our work, all of the fermented wines had the ethyl acetate in acceptable level of wines. Our results show that *Torulaspota* had an influence on mixed and especially sequential fermentations ester production.

In our work the 2 yeasts were not affected in the same manner when they grew together. In mixed cultures *Saccharomyces* growth was not affected whereas *Torulaspota* growth was reduced. Moreover, during the stationary phase the viability of *Saccharomyces* remained constant whereas that of *Torulaspota* decreased regularly. This was observed even when the *T. delbrueckii* strain was dominant at the outset: the high ratio T/S corresponds to 95% of the non *Saccharomyces* yeast. In sequential cultures whatever the nitrogen content in the medium (MS300 or MS170) the decrease in *Saccharomyces* growth was due to nitrogen deficiency, but no decrease of viability was observed. That said, the viability of *Torulaspota* started to decrease as soon as the *Saccharomyces* were inoculated. Mauricio et al (1998) and Hansen et

al (2001) suggested that the death of *Torulaspota* in mixed cultures at low available oxygen levels was due to the lack of this compound. Nevertheless, in our work all experiments were performed under nitrogen flux and the anaerobiosis could not be incriminated for the decrease of *Torulaspota* viability during mixed and sequential culture, since the viability always remained at a high level for the pure fermentations.

Nissen et al (2003) proposed another mechanism to explain the *Torulaspota* growth arrest in mixed cultures with *Sacchaomyces*: the negative effect of cell-to-cell contact due to high space competition. In our case, since the 2 yeasts were separated by a hollow fibre membrane in the membrane bioreactor, this hypothesis could not be retained.

Our data instead indicates a phenomenon of amensalism exerted by *Saccharomyces* towards *Torulaspota*. Such kind of interaction was previously suggested by Farkas et al, (2005). Ciani et al (2010) reported that some negative interactions between *Saccharomyces* and non *Saccharomyces* could be due to acetaldehyde or acetoin. Some others authors implicate killer toxin factors as being responsible for amensalism towards non *Saccharomyces* (Zagore et al., 2001 and Pérez et al., 2006) In fact, *S. cerevisiae* has been long proved to produce K2 killer toxins or competitive factors (Jacobs et al., 1991). Nevertheless, Renault et al., (2009) showed no inhibition effect of K2 toxins secreted by *S. cerevisiae* on any of the 17 tested *T. delbrueckii* wine-related strains. Recently, Albergaria et al., (2010) found some 2-10 kDa peptides produced by *S. cerevisiae* that inhibited the growth of *T. delbrueckii* wine-related strains. Consequently, the killer toxins or antimicrobial peptides effect on *T. delbrueckii* developments in the mixed or sequential cultures with *S. cerevisiae* need to be further screened.

In conclusion, in mixed cultures or in the case of inoculation of *T. delbrueckii* in a grape must containing *S. cerevisiae*s indigenous populations, the non *Saccharomyces* yeast should always be overcome by *Saccharomyces*, hence decreasing the impact of *Torulaspota* on the fermented wine. The sequential inoculation guarantees the development of *T. delbrueckii* prior to the inoculation by *Saccharomyces*. Nevertheless, in this case the medium should contain enough assimilable nitrogen to allow the development of *Saccharomyces* and a good fermentation rate.

Acknowledgements

We would like to thank the Vietnamese and French Governments for providing the grant and Lallemand S.A.S., France for providing yeast strains.

We are grateful to Jennifer Stephenson for helping us for revising the English version.

III-3-5 References

- Albasi, C., Tartaridis, P., Taillandier, P. and Strehaiano, P., 2002. A new tool for the quantification of microbial interactions in liquid medium: application to wine lactic acid bacteria. *Sc. Aliments*. 22, 189-198.
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N. and Gírio, F., 2010. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 86, 965-972.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. and Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 122, 312-320.
- Ciani, M. and Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 14, 199-203.
- Ciani, M. and Pepe, V., 2002. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82, 573-578.
- Ciani, M., Beco, L. and Comitini F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 108, 239-245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. and Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res*. 10, 123-133.
- Farkas, G., Rezessy-Szabo, J.M., Zakany, F. and Hoschke, A., 2005. Interaction of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast strains in an alcoholic fermentation process. *Acta Alimentaria*. 34(1), 81-90.
- Fleet, G. H. and Heard, G. M., 1993. Yeasts - growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp27.
- Hansen E. H., Nissen P., Sommer P., Nielsen J.C. and Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 541-547.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P. J. and Cabezudo, M. D., 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*. 41, 313-318.
- Jackson, R., 1994. Chemical constituents of grapes and wine. In: Taylor, S.L. (Ed.), *Wine Science. Principles and Applications*. Academic Press, San Diego. pp178.
- Jacobs, C. J. and van Vuuren, H. J. J., 1991. Effect of different killer yeasts on wines fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 42, 295-230.
- Lema, C., Garcia-Jares, I. and Angulo, L., 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*. 47, 206-216.

- Mauricio, J. C., Moreno, J., Valero, E. M., Zea, L., Medina, M., and Ortega, J. M. 1998. Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 14, 405-410.
- Miller, G. L., 1959. Use of DNS acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chem. 31, 426-428.
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T. and Vasconcelos, I., 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), 231-238.
- Moreno, J. J., Millán, C., Ortega, J. M., and Medina, M., 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 7, 181-189.
- Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*. 20, 331–341.
- Ocón, E., Gutiérrez A. R., Garijo P., Tenorio C., López I., López R., and Santamaría P., 2010. Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. Eur Food Res Technol. 230, 885-891.
- Pérez N. F., Albergaria H., Hogg T., and Girio F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology. 1(108), 336-345.
- Pillet, O., Aguera, E., Silvano, A. et Languet, P., 2010. Ensemencement séquentiel d'une levure non-*Saccharomyces* et d'une levure *Saccharomyces cerevisiae*, Vers de nouveaux horizons aromatiques. Revue des Œnologues.135, 13-18.
- Rapp, A., 1993. Foreign and undesirable flavours in wine. Les acquisitions récentes en chromatographie du vin; Tec. et Doc. - Lavoisier, Paris, pp. 151-173.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A. and Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology. 134, 201-210.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G. and Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. Journal of Applied Microbiology. 100, 1208-1219.
- Rojas, V., José Gil V., Piñaga, F. and Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. International Journal of Food Microbiology. 70(3), 283-289.

- Salgado M. E., Albasi C. and Riba J. P., 2000. A Two-Reservoir, Hollow-Fiber Bioreactor for the Study of Mixed-Population Dynamics: Design Aspects and Validation of the Approach, *Biotechnology and Bioengineering*. 69(4), 401-408.
- Salmon, J. P. and Barre, P., 1998. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10), 3831-3837.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer and M. I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. Journal of Food Microbiology*. 108, 376-384.
- Zagorc, T., Maráz, A., Cadez, N., Povhe, J. K., Péter, G., Resnik, M., Nemani, J. and Raspor, P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology*. 18(4), 441-451.

CHAPITRE IV. CONCLUSION GLOBALE ET PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail étaient d'une part de mieux connaître le métabolisme d'une souche œnologique *Torulaspora delbrueckii*, et en particulier l'effet de l'oxygène sur celle-ci, et d'autre part de déterminer l'existence ou non d'interactions de cette souche avec une levure œnologique de *Saccharomyces cerevisiae* durant la FA de jus de raisins blancs.

Pour ce qui est de l'influence de l'oxygène sur le métabolisme de *T. delbrueckii*, des fermentations pures ont été réalisées avec des débits d'aérations allant de l'anaérobie à un débit maximum de 9,2 mmol/l/h, largement supérieur à ce qui se fait en conditions œnologiques. Ces essais ont montré que l'oxygène favorisait la voie de croissance cellulaire au détriment de la voie fermentaire. La quantité de glycérol produite a été également très affectée, l'absence d'oxygène augmentant très considérablement sa concentration finale. La capacité de cette souche à consommer l'oxygène présent s'est avérée très importante dans la mesure où même pour le plus fort débit, l'oxygène est devenu rapidement limitant dans les fermentations (oxygène dissous nul). Toutefois, bien que « gourmande » en oxygène, cette levure a fermenté en condition anaérobie la totalité des sucres présents en un temps certes plus long qu'en présence d'oxygène mais tout de même acceptable. Il est vrai toutefois que le milieu contenait des facteurs anaérobies (acides gras et stérols). Cette souche semble donc particulièrement bien adaptée aux conditions de la fermentation dans le contexte œnologique.

En ce qui concerne l'étude des interactions, les cinétiques de référence des fermentations en culture pures ont tout d'abord été établies. Les différents dispositifs expérimentaux testés (erlenmeyer, bioréacteur à membrane avec bullage d'air et bioréacteur à membrane sous azote) ont permis d'évaluer l'impact de l'oxygénation sur les cinétiques fermentaires dans des gammes assez proches de ce qui peut être rencontrées en conditions œnologiques. La comparaison entre les deux souches pures a ainsi montré que *S. cerevisiae* avait de meilleures performances fermentaires que *T. delbrueckii* en terme essentiellement de durée de fermentation quelles que soit les conditions expérimentales. *T. delbrueckii* s'est également révélée plus sensible à la présence d'oxygène que *S. cerevisiae* en ce qui concerne sa croissance. Enfin, l'analyse des esters en fin de fermentation a bien montré que ces deux souches produisaient des profils aromatiques différents. Les conditions d'anaérobie stricte (BRM sous azote sans bullage) ont été alors choisies pour l'étude des interactions, l'apport d'oxygène dans les vinifications en blanc étant quasi nul.

Le deuxième objectif de ce travail était d'étudier les interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* pendant la fermentation du vin. Dans nos essais réalisés avec un moût synthétique relativement riche en azote assimilable, il s'est avéré que la souche de *S. cerevisiae* avait un impact négatif sur cette souche de *T. delbrueckii*. Dès l'inoculation de *S. cerevisiae*, celle-ci se développait normalement, comme en culture pure, alors que la souche de *T. delbrueckii* connaissait une chute importante de sa viabilité. Que ce soit en culture séquentielle (inoculation de *T. delbrueckii* puis inoculation de *S. cerevisiae* 48h après), en co-inoculation avec des niveaux de population équivalents ou en co-inoculation avec un niveau de *T.*

delbrueckii 20 fois plus importants que celui de *S. cerevisiae*, la croissance de *T. delbrueckii* a été inhibée par rapport à sa culture pure. Donc, pour ces essais, il y a eu interaction négative de *S. cerevisiae* sur *T. delbrueckii* mais absence d'interaction de *T. delbrueckii* sur *S. cerevisiae*. Cela se traduit notamment par une perte de viabilité observé chez *T. delbrueckii*. Le mécanisme d'interaction supposé est celui d'amensalisme puisque les interactions directes sont exclues par la nature du dispositif expérimental et qu'il ne s'agit pas uniquement de compétition pour le substrat dans la mesure où on assiste à une chute de viabilité de l'une des deux levures. L'hypothèse la plus probable est l'excrétion d'une molécule par *S. cerevisiae* qui empêche le développement de *T. delbrueckii*.

Cependant, lors d'une fermentation séquentielle dans un milieu moins riche en azote assimilable, *S. cerevisiae* n'a pas été capable de se développer en raison de l'épuisement de l'azote du à la croissance de *T. delbrueckii* durant les 48 premières heures de fermentation. Lors de l'inoculation de *S. cerevisiae*, la viabilité des *T. delbrueckii* a chuté et les *S. cerevisiae* ne se sont pas développées ce qui a entraîné un arrêt de fermentation.

En conséquence, la meilleure stratégie d'inoculation semble donc être tout d'abord une inoculation de *T. delbrueckii* seule lui permettant de se développer dans le moût, puis une inoculation de *S. cerevisiae* 48 h après afin d'assurer une fin de fermentation rapide. Toutefois, d'un point de vue industriel, il faudra être vigilant sur les mouts à faible teneur en azote assimilable qui peuvent être problématique comme l'ont montré nos résultats.

D'un point de vue profil aromatique, toutes les fermentations mixtes et séquentielles ont produit plus d'acétate d'isoamyle et de lactate d'éthyle et moins d'octanoate et de décanoate d'éthyle par rapport à la culture pure de *S. cerevisiae*. La présence de *T. delbrueckii* a donc un réel impact sur le profil aromatique final obtenu. En perspectives à ce travail, l'identification plus précise du phénomène d'interaction serait à prévoir. Isoler la ou les molécules produites par *S. cerevisiae* permettrait de conclure sur le phénomène d'amensalisme supposé.

Tester cette souche de *T. delbrueckii* contre d'autres souches de *S. cerevisiae* serait également intéressant afin de voir si ce phénomène est généralisé ou non pour l'ensemble de l'espèce.

Enfin l'extrapolation de l'impact sur le profil aromatique des vins est à confirmer an conditions réelles et pour des mouts de raisin de composition, notamment azotée différente. Les nombreux essais déjà réalisés en sites industriels semblent prometteurs.

CHAPITRE V. RÉFÉRENCES

- Akin, H., Brandam C., Meyer X.M., and Strehaiano, P., 2008. A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering and Processing*. 47, 1986 - 1993.
- Albasi, C., Riba, J.P., Salgado, E., Mona, J.P., and Espenan, J.M., 1998. Brevet déposé sous le No.98.09563.
- Albasi, C., Tartardis, P., Taillandier, and P., Strehaiano, P., 2002. A new tool for the quantification of microbial interactions in liquid medium: application to wine lactic acid bacteria. *Sc. Aliments*. 22, 189 - 198.
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., and Gírio, F., 2010. *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 86, 965 – 972.
- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M.J., Spencer-Martins, I., Leão, C., and Sousa, M.J., 2007. Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Microbiology*. 153, 898-904.
- Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddardm M.R., 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Savignon Blanc. *Aust J Grape Wine*. 15 (R), 1 - 8.
- Aragon, P., Atienza, J., and Climent, A.D., 1998. Influence of clarification, yeast type, and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohols of Malvasia and Muscatel Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49 (2), 211 - 219.
- Bartowsky, E.J., and Pretorius, I.S., 2009. Microbial Formation and Modification of Flavor and Off-Flavor Compounds in Wine, in H. König et al., (eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 209 - 231.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2005. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53(4), 996 - 1002.
- Bely, M., J.M. Sablayrolles, and Barre, P., 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*. 41. 319 - 324.
- Bely, M., Rinaldi, A., and Dubourdieu, D., 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96, 507 - 512.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 122, 312 - 320.

- Blateyron, L., and Aguera, E., 1998. Control of oxygen additions during alcoholic fermentations. *Vitic. Enol. Sci.* 53, 131 - 135.
- Blomberg, A., and Alder, L., 1989. Role of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 171, 1087 - 1092.
- Blomberg, A., and Alder, L., 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advanced in Microbiology and Physiology*. 33, 145 - 212.
- Boender, L.G.M., de Hulster, E.A.F., van Maris, A.J.A., Daran-Lapujade, P.A.S., and Pronk J.T., 2009. Quantitative Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at Near-Zero Specific Growth Rates. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(17), 5607 – 5614.
- Boles, E., De Jong-Gubbels, P., and Pronk, J.T., 1998. Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* 180, 2875 - 2882.
- Bonilla-Sallnas, M., Lappel, P., Ulloal, M., Garcia-Garibay, M., and Gomez-Ruiz L., 1995. Isolation and identification of killer yeasts from sugar cane molasses. *Letters in Applied Microbiology*. 21, 115 - 116.
- Bunte, Annicka, 2009. Non-*Saccharomyces* wine yeast, CHR. Hansen. http://www.chr-hansen.es/uploads/media/A._Bunte_Non-conventional_wine_yeast_03.pdf.
- Cabrera, M.J., Moreno, J., Ortega, J.M., and Medina, M., 1988. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39, 283 – 287.
- Cheraiti, N., Guezenc, S., and Salmon, J.M., 2005. Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Appl Environ Microbiol.* 71, 255 – 260.
- Charoenchai, C., Fleet G.H., and Henschke P.A., 1998. Effects on the temperature and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49(3), 283 - 288.
- Ciani, M., 1995. Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *J Appl Bacteriol.* 79.631–634.
- Ciani, M., and Picciotti, G., 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol Lett.* 17, 1247-1250.
- Ciani, M., and Ferraro, L., 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl Environ Microb.* 62. 128–132.

- Ciani, M., and Ferraro, L., 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J Appl Microbiol.* 85, 247–254.
- Ciani, Maurizio, and Maccarelli, Francesco, 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 14, 199 - 203.
- Ciani, M., Ferraro, L., and Fatichenti., F., 2000. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme Microb Tech.* 15. 698–703.
- Ciani, Maurizio, and Pepe, Valdes, 2002. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 82, 573 - 578.
- Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of wine yeast fermentations. *Int. Journal of Food Microbiology.* 108, 239 - 245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123 - 133.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J. and Rodríguez-Vico, F., 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology.* 98(3), 301 - 308.
- Cocolin, L., and Mills, D.A., 2003, Wine yeast inhibition by sulphur dioxide: A comparison of culture-dependent and independent methods. *American Journal of Enology and Viticulture.* 54(2), 125 - 130.
- Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 235 - 240.
- Crabtree, H.G., 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23, 536 - 545.
- de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A., 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 47. 4003 – 4008.
- de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A. Etudes des composés dicarbonylés au cours des fermentations alcooliques et malolactiques. in Œnologie 95 : 5e. Symposium International d'Œnologie, Lonvaud-Funel A., Technique & Documentation, Paris.
- Delaquis, P., Cliff, M., King, M., Girard, B., and Reynolds, A., 2000. Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of Chancellor wines

- vinified with different yeasts and fermentation temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture*. 51, 42 – 48.
- Dijken, J.P., and van Scheffers, W.A., 1986, Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* 32, 199 - 224.
- Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot des Gachons, C., and Murat, M.L., 2000. The role of yeasts in grape flavour development and during fermentation : the example of Sauvignon blanc. Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, Washington, USA, 196 – 203.
- Erasmus, D.J., van der Merwe, G.K., van Vuuren, H.J.J., 2003. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*. 3, 375 - 399.
- Erasmus, D.J., Cliff, M., and van Vuuren, H.J.J., 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of Icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 55, 371 - 378.
- Farkas, G., Rezessy-Szabo., J.M., Zakany, F., and Hoschke, A., 2005. Interaction of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast strains in an alcoholic fermentation process. *Acta Alimentaria*. 34(1), 81 - 90.
- Fleet, G.H., and Heard, G.M., 1993. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 27 - 54.
- Francis, I.L., and Newton, J.L., 2005. Determining wine aroma from compositional data. *Aust J Grape Wine Res.* 11, 114 - 126.
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., Hamachi, M., 1994. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2786 – 2792.
- Furukawa, K., Heinzle, E., and Dunn, I.J., 1983. Influence of oxygen on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 25, 2293-2317.
- Gambaro, A., Boido, E., Zlotajablko, A., Medina, K., Lloret, A., Dellacassa, E., Carrau, F., 2001. Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust J Grape Wine Res.* 7, 27 – 32.
- Garcia, A., Carcel, C., Dalau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., and Gunata, Z., 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles in a Muscat wine. *J Food Sci.* 67: 1138 – 1143.

- Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C., 2006. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *Eur Food Res Technol.* 222, 15 – 25.
- Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C., 2008. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology.* 41(3), 501 - 510.
- Giudici, P., Romano, P., and Zambonelli, C., 1990. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol.* 36, 61 – 64.
- Gockowiak, H., and Henschke, P.A., 1992. Nitrogen composition of grape juice and implications for fermentation: results of a survey made in N-E Victoria. *Aust. Grapegrower Winemaker.* 340 (131), 133 - 138.
- Hanl, L., Sommer, P., and Arneborg, N., 2005. The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67, 113 - 118.
- Hansen, E.C., 1883. Undersogelser over alkoholgjaersvampenes fysiologi og morfologi. 11. Om askosporedannelsen hos slægten *Saccharomyces*. *Medd. Carlsberg Lab.* 2, 29 - 86.
- Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V., 2008. The development of varietal aroma from non-oral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry.* 107, 1064 - 1077.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., Cabezudo, M.D., 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture.* 41, 313 - 318.
- Holm, H.E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., and Arneborg N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology.* 91, 541 - 547.
- Inoue, Y., Trevanichi, S., Fukuda, K., Izawa, S., Wakai, Y., Kimura, A., 1997. Roles of esterase and alcohol acetyltransferase on production of isoamyl acetate in *Hansenula mrakii*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 45, 644 - 649.
- Jackson, R., 1994. Chemical constituents of grapes and wine. In: Taylor, S.L. (Ed.), *Wine Science. Principles and Applications.* Academic Press, San Diego. 178 - 219.
- Jacobs, C.J., and van Vuuren, H.J.J., 1991. Effect of different killer yeasts on wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture.* 42, 295 - 230.

- James, S.A., Collins, M.D., and Roberts I.N., 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 189 - 194.
- Julien, A., Roustan J.L., Dulau, L., and Sablayrolles, J.M., 2000. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. *American Journal of Enology and Viticulture.* 51(3), 215 - 222.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., and Pretorius I.S., 2003. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S Afr J Enol Vitic.* 24, 63 - 69.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., and Nerantzis, E., 2007. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microb Biot.* 23: 735 - 739.
- Kim, D.H., Hong, Y.A., and Park., H.D., 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic content in wine. *Biotechnol Lett.* 30, 1633 – 1638.
- Krieger, S., Triolo, G., Dulau, L., 2000. Bacteria and Wine Quality - State of the Art. Article at www.lallemandwine.com.
- Kreger-van Rij, N.J.W., 1984. *The Yeasts. A Taxonomic Study.* Elsevier, Amsterdam.
- Kurita, O., 2008. Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*. *J Appl Microbiol.* 104, 1051 – 1058.
- Lagunas, R., 1986. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2, 221 – 228.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., and Ribereau-Gayon P., 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 874 - 880.
- Lange, H., Bavouzet, J.M., Taillandier, P., Delorme, C., 1993. Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnology Techniques.* 7(3), 223 - 228.
- Lambrechts, M.G., and Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma: a review. *S Afr J Enol Vitic.* 21, 97 – 129.
- Languet, P., Ortiz-Julien, A., Aguera, E., Samson, A., and Salmon, J.M., 2005. Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. *Revue des Œnologues.* 117, 31 - 33.

- Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., and Angulo, L., 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*. 47(2), 206 - 216.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., and Pretorius I.S., 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol*. 66, 744 – 753.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D., and Pretorius I.S., 2006. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*. 23, 641 – 659.
- Lindner, P., 1895. Mikroskopische betriebskontrolle in den garungsgewerben. P. Parey, Berlin. Germany.
- Lodder, J., and Kreger-van Rij, N.J.W., 1952. The yeasts: a taxonomic study. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*. 126, 209 - 214.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., and Ledoux O., 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *Journal of Applied Bacteriology*. 71(8), 501 - 508.
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., and Salmon, J.P., 2004. Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65, 25 – 32.
- Maicas, S., Gil, J.V., Parde, I., and Ferrer, S., 1999. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International*. 32, 491 - 496.
- Marais, J., 2001. Effect of grape temperature and yeast strain on Sauvignon blanc wine aroma composition and quality. *S Afr J Enol Vitic*. 22, 47 – 51.
- Mauricio, J.C., J. Moreno, M. Medina and J.M. Ortega. 1990. Fermentation of "Pedro Ximenez" musts at various temperatures and different degrees of ripeness. *Belg. J. Food Chem. Biotechnol*. 41, 71 - 76.
- Mauricio, J.C., Guijo, S., Ortega, J.M., 1991. Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *American Journal of Enology and Viticulture*. 42, 301 - 308.

- Mauricio, J.C., Moreno, J., Valero, E.M., Zea, L., Medina, M., Ortega, J.M., 1993. Ester formation and specific activities of in vitro alcohol acetyltransferase and esterase by *Saccharomyces cerevisiae* during grape must fermentation. *J. Agric. Food. Chem.* 41, 2086 – 2091.
- Mauricio, J.C., Moreno, J., Zea, L., Ortega, J.M., and Medina, M., 1997. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Sci. Food Agric.* 75, 155–160.
- Mauricio, J.C., Moreno, J., Valero, E.M., Zea, L., Medina, M., Ortega, J.M., 1998. Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 14, 405 - 410.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leao, C., 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology.* 97, 540 – 545.
- Merico, A., Sulo, P., Piškur, J., Compagno, C., 2007. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS Journal.* 274: 976-989.
- Miller, G.L., 1959. Use of DNS Acid Reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chem.* 31, 426 - 428.
- Miler, A.C., Wolff S.R., Bisson, L.F., and Ebeler, A.C., 2007. Yeast strain and nitrogen supplementation: Dynamics of volatile ester production in Chardonnay juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture.* 58(4). 470 - 483.
- Mendoza, L.M., Manca de Nadra, M.C., and Far'ias, M.E., 2007. Kinetics and metabolic behaviour of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnol Lett.* 29, 1057 – 1063.
- Myers, D.K., Lawlor, D.T.M., Attfield, P.V., 1997. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology.* 63(1), 145 – 150.
- Mora, J., Barbas, J.I, Mulet, A., 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture.* 41. 156 – 159.
- Moreira N., 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol.* 103. 285 – 290.
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T. and Vasconcelos, I., 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), 231 - 238.
- Moreno, J.J., Millán, C., Ortega, J.M., Medina, M., 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 7, 181 - 189.
- Nehmé, N., 2008. Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. PhD report. INP de Toulouse, France.
- Nielsen, J. C. and Richelieu, M., 1999. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, No. 2, 740 - 745.
- Nissen, P., and Arneborg N., 2003. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. 180, 257 - 263.
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2004. The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeasts play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, 543–550.
- Noble, A.C., and Bursick, G.F., 1984. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 35, 110 – 112.
- Neuberg, C., 1946. The Biochemistry of Yeast. *Ann. Rev. Biochem.* 15. 435-472.
- OIV, Organisation Internationale, 2009. Note de conjoncture mars 2009, Statistiques. http://news.reseau-concept.net/images/oiv/Client/2009_note_conj_mars_FR_compilee.pdf.
- Ocón, E., Gutiérrez A. R., Garijo P., Tenorio C., López I. and López R., Santamaría P., 2010. Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *Eur Food Res Technol*. 230, 885 – 891.
- Oda, Y., Yabuki, A.M., Tonomura, O.K., and Fukunara, M., 1997. Reexamination of yeast strains classified as *Torulasporea delbrueckii* (Lindner). *Int. J. Syst. Bacteriol*. 47(4), 1102 - 1106.
- O’Kennedy, K., and Reid, G., 2008, Yeast Nutrient Management in Winemaking. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderon, F., Suárez-Lepe, J.A., 2009. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chem*. 112, 432 – 441.
- Pasteur, L., 1866. Etudes sur le vin. Imprimerie Impériale, Paris, France.

- Pérez-Navado, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*. 1(108), 336 - 345.
- Pigeau, G.M., Inglis, D.L., 2005. Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 112 – 125.
- Pillet, O., Aguera, E., Silvano, A. et Languet, P., 2010. Ensemencement séquentiel d'une levure non-*Saccharomyces* et d'une levure *Saccharomyces cerevisiae*, Vers de nouveaux horizons aromatiques. *Revue des Œnologues*. 135, 13 – 18.
- Pina, C., Santos, C., António, C.J., and Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - influence of different culture conditions. *Food Microbiology*. 21(4), 439 - 447.
- Plata, C., Millan, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M., 2003. Formation of ethyl acetate and isomyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20, 217 - 224.
- Pommier, S., Strehaiano, P., and Delia, M.L., 2005. Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism. *Int J. Food Microbiol.* 100, 131 - 139.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 12, 1607 – 1633.
- Radler, F., 1993. Yeast metabolism of organic acids. In: Fleet GH (ed) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic: Chur, Switzerland. 165 – 182.
- Rapp, A., and Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Experientia*. 42, 873–884.
- Rapp, A., 1993. Foreign and undesirable flavours in wine. Paris: TEC&DOC-Lavoisier.
- Reinsch, C., 1967. Smoothing by spline function. *Numer. Math.* 10, 177-183.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., and Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. 134, 201 - 210.
- Renouf, V., 2006. Description et caractérisation de l'écosystème microbien durant l'élaboration du vin, interactions et équilibres. *Thèse de doctorat*, Faculté d'œnologie, Université Bordeaux 2.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G., and Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*. 100, 1208 - 1219.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., et Sudraud P., 1975. Traitement d'œnologie, Sciences et techniques de la vigne et du vin. Tome 2. Ed. Dunod

- Ribéreau-Gayon, P., 1978. Wine aroma. In: Charalambous, G., Inglett, G.E. (Eds.), *Flavour of Foods and Beverages*. Academic Press, New York, pp. 362–371.
- Ribéreau-Gayon, J., Peinaud, E. Ribéreau-Gayon, P. & Sudraud, P., 1989. *Tratado de Enología*, Vol. 2, pp. 223±267. Buenos Aires, Argentina: Editorial Hemisferio Sur S.A.
- Ribéreau-Gayon, P., 1991. *Le vin*. Presses Universitaires de France. Paris, France.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., 1998. *Traité d'oenologie*. Tome 1 Ed. Dunod, Paris.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., and Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology*. Volume 1, In: Ribereau-Gayon, P. (Ed.), *The Microbiology of Wine and Vinifications*. Second Ed. Wiley, New York.
- Rodicio, R., and Heinisch J.J., 2009. Sugar metabolism in yeasts. In : *Biology of microorganisms on grape, in must and in wine*. König H., Uden G. and Frolich J. (Eds), Springer, Berlin. pp 113-134.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., and Leão, C., 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In : *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, ROSA C.A. and Gabor P. (Eds) *The Yeast handbook*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 101-122.
- Rojas, V., José-Gil, V., Piñaga, F., and Paloma, M., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 70(3), 283 - 289.
- Rojas, V., José-Gil, V., Piñaga, F., and Paloma, M., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 181 - 188.
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., Salmon, J.M., 2003. Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: Effect on fermentation kinetics. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 113-121.
- Salgado, M.E., Albasi C., and Riba J.P., 2000. A Two-reservoir, hollow-fiber bioreactor for the study of mixed-population dynamics: Design aspects and validation of the approach. *Biotechnology and Bioengineering*. 69(4), 401 - 408.
- Salmon, J.M., and Barre, P., 1998. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain, *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10), 3831 – 3837.
- Salmon, J.M., Fornairon, C., and Barre, P., 1998. Determination of oxygen pathways in industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86 (2), 154 - 163.

- Salmon, J.M., 2009. L'oxygène au cours de la fermentation alcoolique : mécanismes d'action, gestions des apports et risques associés. Rencontres Œnologiques, Montpellier, France.
- Schneider, V., 1998. Must hyperoxidation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 65-73.
- Soden, A., Henschke, P.A., Oakey, H., Leigh, F., 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian journal of grape and wine research.* 6(1), 21 - 30.
- Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182 – 190.
- Strehaiano, P., Nehme, N., Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Mathieu, F., and Taillandier, P., 2008. Microbial interactions in winemaking. In « bioprocesses in food industry » API-Asiatech Ed, 2, pp 274-289..
- Sumino, Y., Akiyama, S., and Fukuda, H., 1972. Performance of shaking flask. *J. Ferment. Technol.* 50(3), 203-208.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., and Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J Grape Wine Res.* 11, 139 - 173.
- Swiegers, J.H., and Pretorius, I.S., 2005. Yeast modulation of wine flavor. *Adv Appl Microbiol.* 57, 131 – 175.
- Taillandier, P., Gilis, M., Strehaiano, P., 1995. Deacidification by *Schizosaccharomyces*: interactions with *Saccharomyces*, *Journal of Biotechnology.* 40(3), 199 - 205.
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster A., Strehaiano, P., 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content *Food Microbiol.*, 24, 95-100,
- Tataridis, P., 2001. Study of the interactions between wine microorganisms: from the quantity to the quality. PhD report, INP de Toulouse, France.
- Toro, M.E., and Vazquez, F., 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J Microb Biot.* 18, 347 - 354.
- Torrea, D., Fraile, P., Garde, T., Ancin, C., 2003. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control.* 14, 565–571.
- Valero et al., 1998
- Van Der Merwe, C.A., and Van Wyk, C.J., 1981. The contribution of some fermentation products to the odour of dry white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 41–46.

- Van der Walt, J.P., and Johannsen, E., 1975. The genus *Torulaspota* Lindner. Counc. Sci. Ind. Res. Res. Rep. Pretoria. 32, 51-23.
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., Maclean, H., Henschke, P.A., 2009. Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with 'wild' indigenous inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. *Aust J Grape Wine Rape*, in press DOI: 10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R., 2003. Flavour-active esters: adding fruitiness to beer – a practical review. *J Biosci Bioeng.* 96, 110 – 118.
- Viana F, Gil JV, Genovés S, Vallés S, Manzanares P, (2008) Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25:778-785.
- Viana, F., Gil, J.V., Vallés, S., and Manzanares, P., 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology.* 135, 68 – 74.
- Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg, van der Vegte W.H., and van Dijken J.P, 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 56, 3785–3792.
- Visser, W, van der Baan, A.A., Batenburg, van der Vegte, W., Scheffers, W.A., Kramer, R., and van Dijken J.P., 1994, Involvement of mitochondria in the assimilatory metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* cultures. *Microbiology.* 140, 3039 – 3046.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer, M.I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. Journal of Food Microbiology.* 108, 376 - 384.
- Yokotsuka, K., Otaky, A., Naitoh, A., and Tanaka, H., 1993. Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Viticult.* 44, 371 – 377.
- Yoshioka, K., and Hashimoto, H., 1981. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewer's yeast. *Agric. Biol. Chem.* 45, 2183 – 2190.
- Yunoki, K., Yasui, Y., Hirose, S., and Ohnishi, M., 2005. Fatty acids in must prepared from 11 grapes grown in Japan: comparison with wine and effect on fatty acid ethyl ester formation. *Lipids.* 40(4), 361 - 367.

- Zagorc, T., Maráz, A., Cadez, N., Povhe, J.K., Péter, G., Resnik, M., Nemani, J., Raspor, P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology*. 18(4), 441 - 451.
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., and Comin. G., 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 15. 235 – 238.
- Zorhe, D.E. and Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeast on wine fermentation. *Proc. Biochem.* 38, 319 - 324.
- Zott, K., 2008. Les levures non-*Saccharomyces*: dynamique, caractérisation et interaction avec *Saccharomyces* durant les étapes pré-fermentaires et la FA. Thèse de doctorat. Faculté d'œnologie. Université Victoire Segalen Bordeaux2.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., and Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 197 – 203.

ANNEXES

Annexe 01

Composition et mode de préparation de la solution mère d'acides aminés. Dans un Becher de 1 L, dissoudre 20 g de NaHCO_3 dans 500 mL d'eau MilliQ préalablement chauffée à 100 °C. Ajouter successivement les éléments du tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1. Acides aminés de la solution mère

Eléments	Quantité (g/L)	Remarques
Tyrosine	1,4	
Tryptophane	13,7	
Isoleucine	2,5	
Acide aspartique	3,4	Ajout lentement car dégagement de CO_2
Acide glutamique	9,2	Ajout lentement car dégagement de CO_2
Arginine	28,6	
Leucine	3,7	Rincer le Becher de pesée avec de l'eau bouillante
Thréonine	5,8	
Glycine	1,4	
Glutamine	38,6	
Alanine	11,1	
Valine	3,4	
Méthionine	2,4	
Phénylalanine	2,9	
Sérine	6,0	
Histidine	2,5	
Lysine	1,3	
Cystéine	1,0	
Proline	46,8	

Laisser refroidir puis transférer dans une fiole jaugée de 1 Litre. Rincer le Becher et récupérer soigneusement les eaux de rinçage. Homogénéiser la solution jusqu' à dissolution complète. Ajuster le volume à 1 Litre avec de l'eau MilliQ. Repartir la solution en flacon à usage unique. Dater et identifier les flacons. Stockage au congélateur.

Annexe 02

Composition et mode de préparation de la solution mère de facteurs anaérobies.

Tableau 2. Composants de la solution mère de facteurs anaérobies

Eléments	Quantité
Ergostérol	1,5 (g/L)
Acide oléique	0,5 (mL/L)
Tween 80	50 mL
Ethanol 100 %v/v	50 mL

Pour 100 mL de solution mère, peser 1,5 g d'ergostérol, les transférer dans un Erlen. Ajouter 0,5 mL d'acide oléique à partir d'un tube eppendorf. Ajouter dans l'Erlen la solution du mélange éthanol pur/Tween 80 (v/v) en rinçant l'eppendorf. Chauffer pendant 5 min au bain marie à 70 °C puis agiter pour la dissolution complète. Repartir la solution en 10 aliquotes de 10 mL dans des tubes Falcons stériles de 15 mL. Les conserver au frigo à 4 °C après identification et datation.

Annexe 03

Composition et mode de préparation de la solution mère de vitamines.

Dans un Becher de 1 Litre contenant environ 300 mL d'eau MilliQ, ajouter successivement les éléments du tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3. Composants de la solution mère de vitamines

Eléments	Quantité (g/L)
Myo-Inositol	2,0
Pantothénate de calcium	0,15
Thiamine hydrochloryde	0,025
Acide nicotinique	0,2
Pyridoxine	0,025
Biotine	3 mL

Transférer dans une fiole jaugée de 1 Litre ; rincer le Becher et récupérer soigneusement les eaux de rinçages. Homogénéiser la solution et ajuster le volume à 1 Litre avec de l'eau MilliQ. Repartir la solution en flacons à usage unique. Dater et identifier les flacons. Stokage au congélateur.

Annexe 04

Composition et mode de préparation de la solution mère d'oligo-éléments.

Dans un Becher de 1 litre contenant environ 300 mL d'eau MilliQ, ajouter successivement les éléments du tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4. Composants de la solution mère d'oligo-éléments

Eléments	Quantité (g/L)
MnSO ₄ , H ₂ O	4
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4
CuSO ₄ , 5H ₂ O	1
KI	1
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,4
H ₃ BO ₃	1
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄	1

Transférer dans une fiole jaugée de 1 Litre ; rincer le Becher et récupérer soigneusement les eaux de rinçages. Homogénéiser la solution et ajuster le volume à 1 Litre avec de l'eau MilliQ. Repartir et stériliser la solution par filtration dans des flacons stériles. Dater et identifier les flacons puis stockage au réfrigérateur.