

**Emma BONNAUD**



Evaluation des protocoles de vinification et impact des changements  
d'échelle

Encadré par Monsieur Jean-Roch Mouret, Monsieur Marc Perez et Monsieur Christian Picou,  
Unité Mixte de Recherche Sciences pour l'Œnologie.

Stage débutant le 1<sup>er</sup> février 2022 et se terminant le 29 juillet 2022



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

INRAE



L'INSTITUT  
agro Montpellier



Master 2 Microbiologie, parcours Ingénierie et Biotechnologies Microbiennes 2021-2022

Université d'Aix-Marseille Faculté des Sciences



## Remerciements

Ce stage a été réalisé au sein de l'Unité Mixte de Recherches Sciences pour l'Œnologie (UMR SPO) de Montpellier et financé par la Chaire d'entreprises Vigne et Vin. Je tiens donc à remercier l'UMR SPO et la Chaire Vigne et Vin de m'avoir accueillie et permis de réaliser ce stage de fin d'études.

Je tiens à remercier Fabienne Remize, directrice de l'UMR SPO et Agnès Ageorges, directrice adjointe pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'études dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens à remercier tout particulièrement, le responsable de l'équipe FLAM (Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme), Jean-Roch Mouret pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, son écoute et ses conseils qui ont pu faire évoluer ma réflexion sur le sujet de mon stage.

Je souhaite remercier mon deuxième encadrant, Marc Perez pour m'avoir formé sur le robot de fermentation PhenOFerm. Je le remercie pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils.

Je remercie mon troisième encadrant, Christian Picou, technicien de Recherche pour son aide, sa disponibilité, ses précieux conseils et son aide pour la mise en place des expérimentations.

Je les remercie tous les trois pour leur extrême bienveillance, pour avoir suivi mon travail tout le long du stage, pour leur disponibilité et leur écoute. La liste serait trop longue mais un grand merci pour votre accueil et pour votre confiance durant ce stage.

Un grand merci à Faiza Macna, technicienne de Recherche, pour son écoute, sa bienveillance, sa disponibilité et son aide pour la mise en place du robot et des analyses HPLC.

Merci aussi à mes compagnons du sous-sol Sylvia Theoreorids, Fabien Garces, Marion Kssis et Lisa Pirou pour leur gentillesse et pour tous nos bons moments. Merci à Sylvia pour les pauses-café et pour les concerts privés de ukulélé. Un très grand merci à Lisa pour son aide, nos moments de rigolade et de m'avoir soutenu les nuits au labo.

Je voulais aussi remercier Charlie grâce à qui je suis devenue une experte en logiciel R et Teddy pour m'avoir formé à la GC-MS.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble des membres de l'UMR SPO de l'INRAE de Montpellier pour m'avoir si gentiment accueillie, mais aussi pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Merci à tous, ce fut un réel plaisir de pouvoir travailler avec vous pendant ces 6 mois de stage.



## Sommaire

I.	<u>Introduction bibliographique</u> .....	1
A.	<b>La fermentation alcoolique</b> .....	1
1.	Les levures dans la fermentation alcoolique.....	1
2.	La fermentation alcoolique au niveau métabolique.....	1
B.	<b>Caractérisation de la fermentation : cinétique fermentaire et arômes</b> .....	2
1.	Le suivi de la cinétique fermentaire.....	2
2.	Les arômes fermentaires.....	3
2.1	Les alcools supérieurs.....	3
2.2	Les esters.....	3
C.	<b>Effet du moût de raisin sur la fermentation alcoolique</b> .....	4
1.	Effet de l'azote sur la fermentation alcoolique.....	4
2.	Effet des lipides sur la fermentation alcoolique.....	4
D.	<b>Choix de l'échelle de fermentation</b> .....	4
II.	<u>Matériels et méthodes</u> .....	6
•	<b>Interviews</b> .....	6
•	<b>Souche de levure utilisée</b> .....	6
•	<b>Milieus utilisés</b> .....	6
•	<b>Fermentations à trois échelles : 15 mL, 250 mL et 1 L</b> .....	6
•	<b>Suivi de la cinétique fermentaire</b> .....	7
•	<b>Mesure de la population levurienne</b> .....	8
•	<b>Dosage des arômes fermentaires</b> .....	8
•	<b>Détermination de la concentration de métabolites carbonés</b> .....	9
•	<b>Analyses statistiques</b> .....	9
III.	<u>Résultats et discussion</u> .....	10
A.	Les paramètres déterminant le choix de l'échelle de fermentation de travail.....	10
B.	Evaluation des protocoles de vinification haut débit du robot de fermentation PhenOFerm (échelle de 15 et 250 mL).....	11
1.	Evaluation des protocoles de vinification haut débit et impact du changement d'échelle.....	12
•	<b>Effets de l'échelle de fermentation sur la cinétique fermentaire</b> .....	12
•	<b>Evaluation de l'effet du changement d'échelle sur la population levurienne</b> .....	14
•	<b>Effets de l'échelle de fermentation sur la production d'arômes fermentaires et de métabolites carbonés du métabolisme carboné central</b> .....	15
2.	Prévalence de l'effet milieu sur l'effet échelle.....	17
IV.	<u>Conclusion et perspectives</u> .....	19
V.	<u>Références bibliographiques</u> .....	21



## Liste des abréviations et symboles :

® : Marque déposée.

**ACoA** : Acétyl-coenzyme A.

**ACP** : Analyse en composantes principales.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**CoA** : Coenzyme A.

**FAS** : Acide gras synthase.

**g, mg** : gramme, milligramme.

**G1P** : Glycerol-1-phosphate.

**G3P** : Glyceraldehyde-3-phosphate.

**G6P** : Glucose-6-Phosphate.

**GC-MS** : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

**HPLC** : chromatographie liquide haute performance.

**IP** : Iodure de propidium.

**L, mL, µL** : Litre, millilitre, microlitre.

**LSA** : Levures sèches actives.

**MCC** : Métabolisme carboné central.

**MS** : Moût synthétique.

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide.

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**NS** : Non significatif.

**pH** : Potentiel hydrogène.

**rpm** : Révolution par minute.

**SPO** : Sciences pour l'Œnologie.

**UMR** : Unité Mixte de Recherche.

**v<sub>max</sub>** : Vitesse maximale.

**W** : Watt.



## Listes des figures et tableaux

<b>Figure 1.</b> Schéma du MCC chez <i>S. cerevisiae</i> en conditions œnologiques.....	1
<b>Figure 2.</b> Voies de biosynthèse des sous-produits en conditions œnologiques par <i>S. cerevisiae</i> .....	2
<b>Figure 3.</b> Déroulement de la fermentation alcoolique.....	2
<b>Figure 4.</b> Synthèse des alcools supérieurs par la voie d'Ehrlich chez <i>S. cerevisiae</i> .....	3
<b>Figure 5.</b> Impact de la quantité initiale d'azote sur la cinétique de fermentation.....	4
<b>Figure 6.</b> Schémas des dispositifs de fermentation mis en place à l'échelle de 15 mL, 250 mL et 1 L.....	6
<b>Figure 7.</b> Photographies des différents systèmes de fermeture testés.....	7
<b>Figure 8.</b> Photographies du système haut débit PhenOFerm .....	7
<b>Figure 9.</b> Analyse en composantes principales des principaux paramètres cinétiques.....	12
<b>Figure 10.</b> Choix du système de fermeture à partir des cinétiques fermentaires.....	12
<b>Figure 11.</b> Comparaison des cinétiques fermentaires obtenues en 15 mL, 250 mL et en 1 L....	13
<b>Figure 12.</b> Impact du changement d'échelle sur la population cellulaire.....	14
<b>Figure 13.</b> Impact du changement d'échelle sur la viabilité cellulaire.....	15
<b>Figure 14.</b> Impact du changement d'échelle sur les rendements des principaux métabolites carbonés issus du métabolisme carboné central (en g/g <sub>sucré</sub> consommé).....	15
<b>Figure 15.</b> Impact du changement d'échelle sur les rendements des principaux arômes fermentaires (en mg/g <sub>sucré</sub> consommé).....	16
<b>Figure 16.</b> Prédominance de l'effet milieu sur l'effet échelle au niveau de la cinétique fermentaire.....	17
<b>Tableau 1.</b> Effets de l'échelle sur la cinétique fermentaire.....	13
<b>Tableau 2.</b> Tableau présentant les taux de variation entre la modalité optimale et la modalité carencée en stérol.....	18



## Avant-propos

Dans le cadre de mon stage de fin d'études, j'ai pu travailler au sein de l'équipe FLAM située au sein de l'UMR SPO de l'INRAE de Montpellier.

L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) est un organisme français fondé en 1946 pour répondre aux besoins alimentaires de la population française en période d'après-guerre (retard considérable en agriculture). Cet institut a pour mission principale de mettre la science et la technologie au service de l'agriculture pour améliorer les techniques d'élevage et d'agriculture. Cet établissement public à caractère scientifique et technologique est rattaché aux ministères de l'Agriculture, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. Il est devenu depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2020, l'INRAE (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) par la fusion de l'INRA et IRSTEA (Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture).

Le centre INRAE de Montpellier est réparti en 8 sites dans le Languedoc-Roussillon. Il comprend 26 unités (dont 20 UMR) et des terrains expérimentaux et possède de nombreux partenariats tel qu'avec l'Institut Agro ou encore le CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement).

L'UMR SPO de Montpellier est sous la tutelle de l'INRAE, de l'Université de Montpellier et de l'Institut Agro de Montpellier. Il s'agit d'un des principaux pôles de recherche de la filière œnologique. Cet UMR a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'élaboration du vin d'un point de vue physique, chimique et microbiologique. Les recherches s'intéressent aussi aux autres aliments fermentés faisant intervenir les levures (bière et pain). Leurs recherches ont pour objectif de proposer des approches novatrices et de construire des solutions technologiques afin d'adapter les pratiques œnologiques aux attentes sociétales et aux enjeux environnementaux.

L'UMR comprend 60 permanents (chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs et techniciens) issus des 3 organismes tutelles et environ 50 non permanents (doctorants, post-docs, CDD et stagiaires) par année.

Les recherches sont réparties au sein de trois équipes aux thématiques scientifiques liées autour de l'œnologie. Les équipes sont les suivantes :

- L'équipe Adaptation, Diversité, Ecologie des Levures (ADEL)

Cette équipe se focalise sur l'étude de l'écologie et de l'histoire évolutive des levures domestiquées. Leurs travaux portent également sur la compréhension des bases génétiques des



caractères impliquées dans la fermentation et de l'adaptation des levures aux milieux de la boulangerie et de l'œnologie, afin de mieux maîtriser et optimiser les procédés fermentaires.

- L'équipe Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme (FLAM)

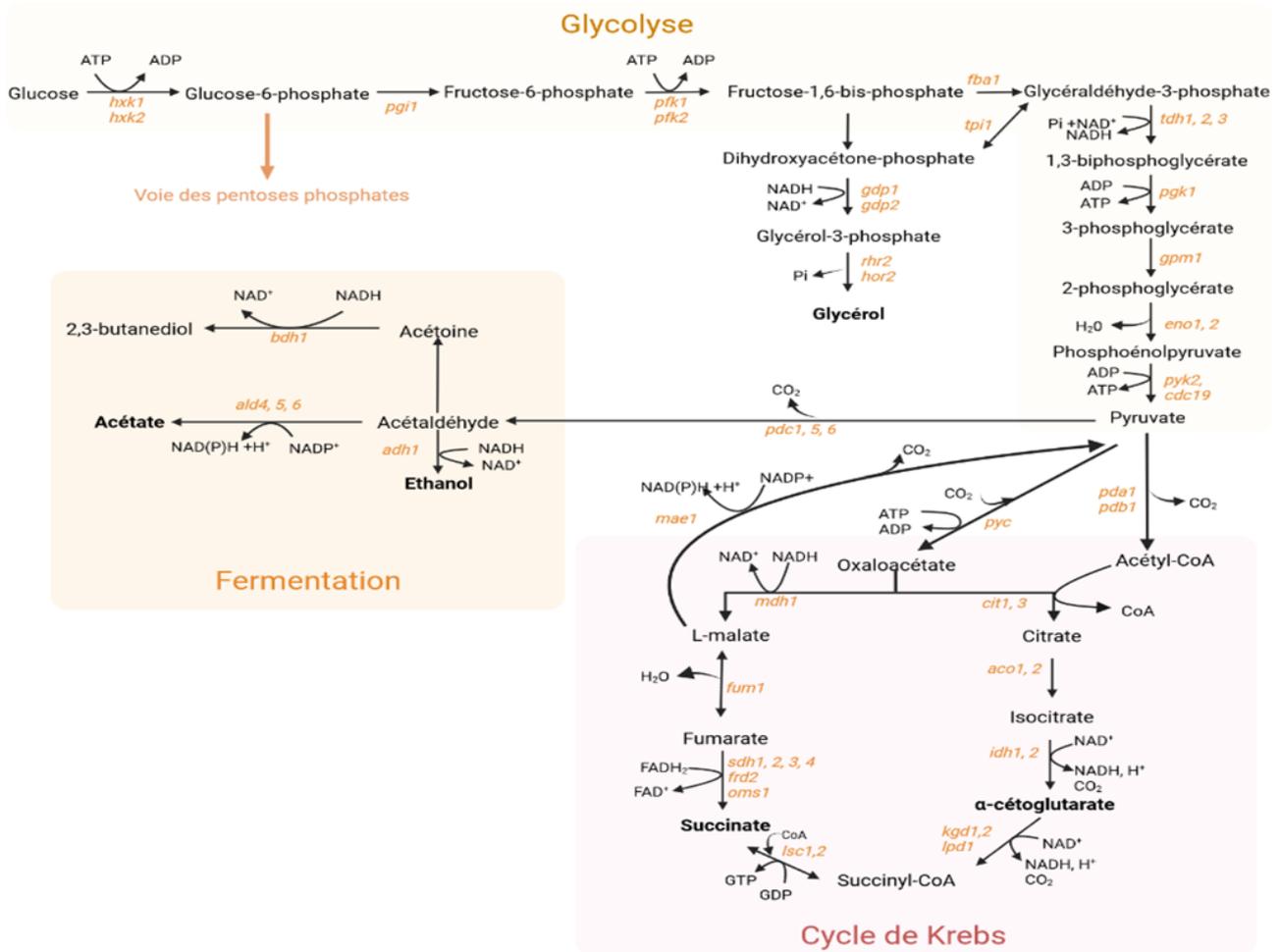
Cette équipe est subdivisée en deux thématiques autour de la fermentation alcoolique. La première thématique de recherche traite des spécificités phénotypiques et du fonctionnement métabolique des levures œnologiques. La deuxième thématique s'intéresse à la maîtrise du procédé de fermentation œnologique afin de contrôler la qualité et le profil aromatique des vins.

- L'équipe Biomolécules d'Intérêt en Œnologie (BIO)

Cette équipe travaille sur la qualité et/ou la typicité du vin par l'étude des relations entre la composition et la qualité et/ou la typicité des vins. L'impact de la matière première, des procédés et des produits œnologiques sur la qualité et la typicité du vin est également étudié. L'objectif final est de répondre aux enjeux environnementaux et sociétaux de la filière œnologique.

L'UMR comporte également des structures collectives, un plateau technique pour l'identification et la quantification de composés volatils, un plateau de fermentation (outils de fermentation multi-échelles, équipements de suivi en ligne et de contrôle de la fermentation), un plateau d'analyses sensorielles et une plateforme analytique pour l'analyse des polyphénols. L'UMR abrite également le CIRM levures (Centre de Ressources Biologiques dédié aux ferments traditionnels français et aux levures impliquées dans les biotechnologies).

Ce stage s'inscrit dans le contexte de l'évolution des pratiques au sein de la filière viti-vinicole. Il est financé par la Chaire Vigne & Vin portée par l'Institut Agro de Montpellier en association avec l'INRAE, l'Université de Montpellier, des partenaires privés et des acteurs socio-économiques de la filière viti-vinicole. Il a pour objectif principal de déterminer l'impact du changement d'échelle sur la fermentation alcoolique (au niveau de la cinétique fermentaire, de la synthèse d'arômes, ...). Plus généralement, ce stage doit également permettre de répondre à une des problématiques majeures de la filière : quelle échelle de fermentation utiliser pour répondre au mieux aux nouveaux défis de la filière ? Ce stage s'appuie sur une étude bibliographique et sur l'évaluation d'échelles de fermentation haut débit. L'ensemble des résultats devrait permettre de répondre en partie à cette question et déterminer quelle échelle de fermentation est adaptée à telle question ou telle pratique.



**Figure 1. Schéma du MCC chez *S. cerevisiae* en conditions œnologiques** (Adaptée de <sup>17</sup>).

En conditions œnologiques, la fermentation alcoolique permet la transformation du glucose en éthanol, en CO<sub>2</sub> et en d'autres sous-produits (glycérol, acétate et succinate). La glycolyse génère de l'ATP nécessaire à la croissance cellulaire et du pyruvate. Le pyruvate est majoritairement converti en éthanol, en acétate et en 2,3-butanediol. L'autre partie est dégradée par le cycle de Krebs. La voie des pentoses phosphates constitue une source de riboses et de NADPH.

Abréviations : *aco1/2* : Aconitate hydratase ; *adh1* : Alcool déshydrogénase ; *ald4-6* : Aldéhyde déshydrogénase ; *bdh1* : Butanediol déshydrogénase ; *cit1/3* : Citrate synthase ; *eno1/2* : Phosphopyruvate hydratase ; *fba1* : Fructose 1,6 bisphosphate aldolase ; *fum1* : Fumarase ; *frd2* : Fumarate réductase ; *gpd1/2* : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase ; *gpm1* : Phosphoglycérate mutase ; *hxx1/2* : Héxokinase ; *hor2* : G1P phosphohydrolase ; *pgi1* : G6P isomérase ; *kgd1/2* :  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase ; *lpd1* : Dihydrolipoyl déshydrogénase ; *lsc1/2* : Succinyl-CoA ligase ; *mae1* : Enzyme malique ; *mdh1* : Malate déshydrogénase ; *pfk1/2* : Phosphofructokinase ; *pgk1* : Phosphoglycérate kinase ; *pyk2* : Pyruvate kinase ; *cdc19* : Pyruvate kinase 1 ; *pyc* : Pyruvate carboxylase isozyme ; *pda1/pdb1* : Sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la pyruvate déshydrogénase E1 ; *idh1/2* : Isocitrate déshydrogénase ; *pdcl1/5/6* : Pyruvate decarboxylase ; *oms1* : Fumarate réductase ; *rhr2* : DL-glycérol-3-phosphatase ; *sdh1-4* : Succinate déshydrogénase ; *tdh1-3* : G3P déshydrogénase et *tpi1* : triose phosphate isomérase.

## I. Introduction bibliographique

La fermentation alcoolique, étape clé de la vinification, est au centre de nombreuses recherches visant à maîtriser et améliorer le procédé de fabrication des vins. Ces dernières années, la recherche en œnologie fait face à de nouveaux enjeux (réchauffement climatique, émergence de nouvelles variétés de raisin, ...) et à l'évolution des goûts des consommateurs (pratiques plus durables, vins plus aromatiques). Pour répondre à ces problématiques, des installations spécifiques à différentes échelles (screening haut débit, phase pilote, ...) avec un environnement contrôlé et imitant les conditions réelles de cave doivent être mises en place.

### A. La fermentation alcoolique

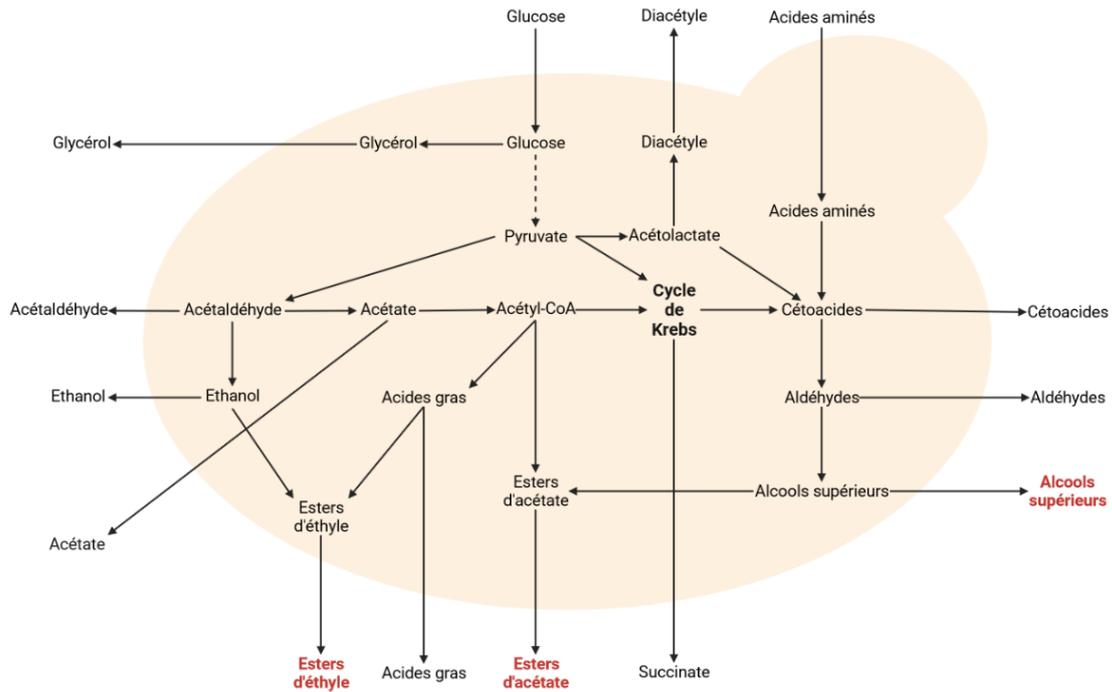
#### 1. Les levures dans la fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique met en jeu des micro-organismes et plus particulièrement des levures, permettant de convertir les hexoses du moût de raisin en éthanol et en CO<sub>2</sub>, selon la réaction suivante :  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2C_2H_6O$ .<sup>15</sup> Ce processus anaérobie peut être initié spontanément par la flore indigène (levures *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces* et bactéries sauvages) présente sur la matière première et les installations viticoles.<sup>23</sup> Cependant, elle est principalement initiée par levurage à l'aide de souches de *Saccharomyces cerevisiae* sous forme de levures sèches actives (LSA) (entre 1 et  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL). Cette pratique permet de mieux contrôler le déroulement de la fermentation et les propriétés organoleptiques du vin.<sup>6,18</sup>

*S. cerevisiae*, espèce de la flore indigène la mieux adaptée aux conditions de fermentation (pH acide, hautes concentrations en éthanol et en SO<sub>2</sub>) est la plus employée en œnologie.<sup>2,8</sup> Ce micro-organisme est un eucaryote unicellulaire, aérobie-anaérobie facultatif et Crabtree positif (peut se développer rapidement par fermentation en présence de hautes concentrations en sucre et ce même en présence d'oxygène).<sup>12</sup> Il est retrouvé majoritairement dans des environnements anthropiques comme les vignobles ou des environnements naturels (fruits ou plantes).<sup>2,19</sup> Cette levure, dont le génome est entièrement séquencé depuis 1996, possède un temps de génération en conditions optimales d'environ 3h à 28°C.<sup>4,8</sup>

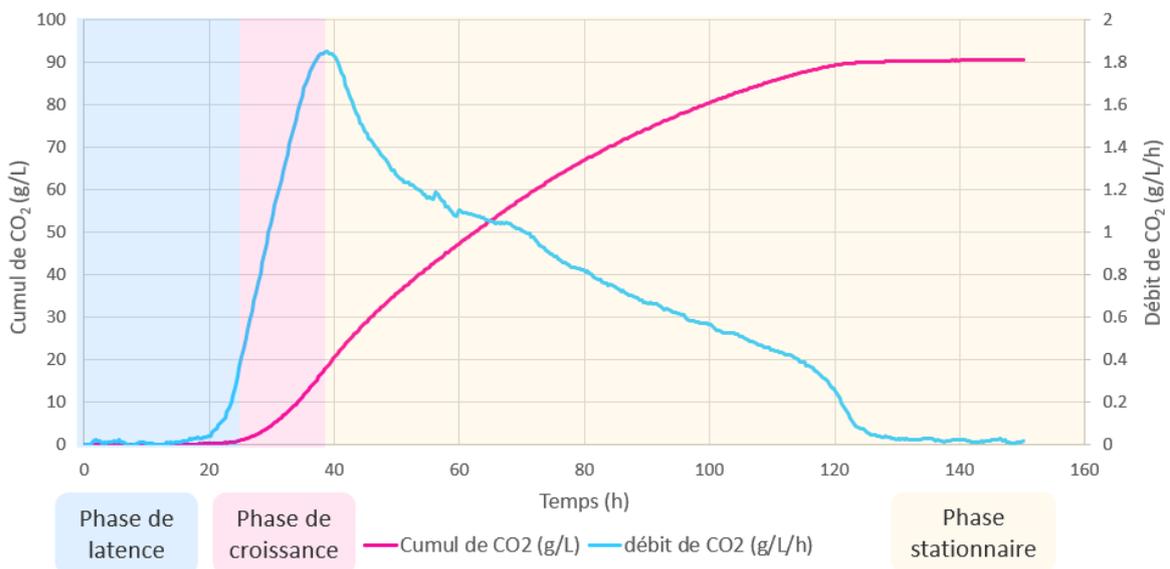
#### 2. La fermentation alcoolique au niveau métabolique

En conditions œnologiques, le métabolisme des levures est purement fermentaire, la teneur en sucre étant haute et la concentration en oxygène étant inférieure à 10 mg/L dans les moûts. L'organisme modèle en viticulture *S. cerevisiae* sera prise en exemple ici (**Figure 1**).<sup>18,19</sup> Les premières étapes de la fermentation alcoolique sont celles de la glycolyse, générant deux



**Figure 2. Voies de biosynthèse des sous-produits en conditions œnologiques par *S. cerevisiae*.**<sup>10,19</sup>

Les sous-produits majoritaires de la fermentation alcoolique sont les alcools supérieurs et les esters. Les esters d'acétate sont issus d'une molécule d'ACoA et d'un alcool supérieur alors que les esters d'éthyle proviennent d'une molécule d'acyl-CoA et d'un éthanol. Les alcools supérieurs, précurseurs des esters d'acétate dérivent d'acides aminés.



**Figure 3. Déroulement de la fermentation alcoolique.**

Le suivi en ligne du dégagement de CO<sub>2</sub> (en rose) permet de calculer la vitesse instantanée de dégagement de CO<sub>2</sub> (en g/L/h) appelée vitesse de fermentation (en bleu). Le suivi de la vitesse de fermentation permet de distinguer les 3 phases technologiques de la fermentation : la phase de latence, la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire.

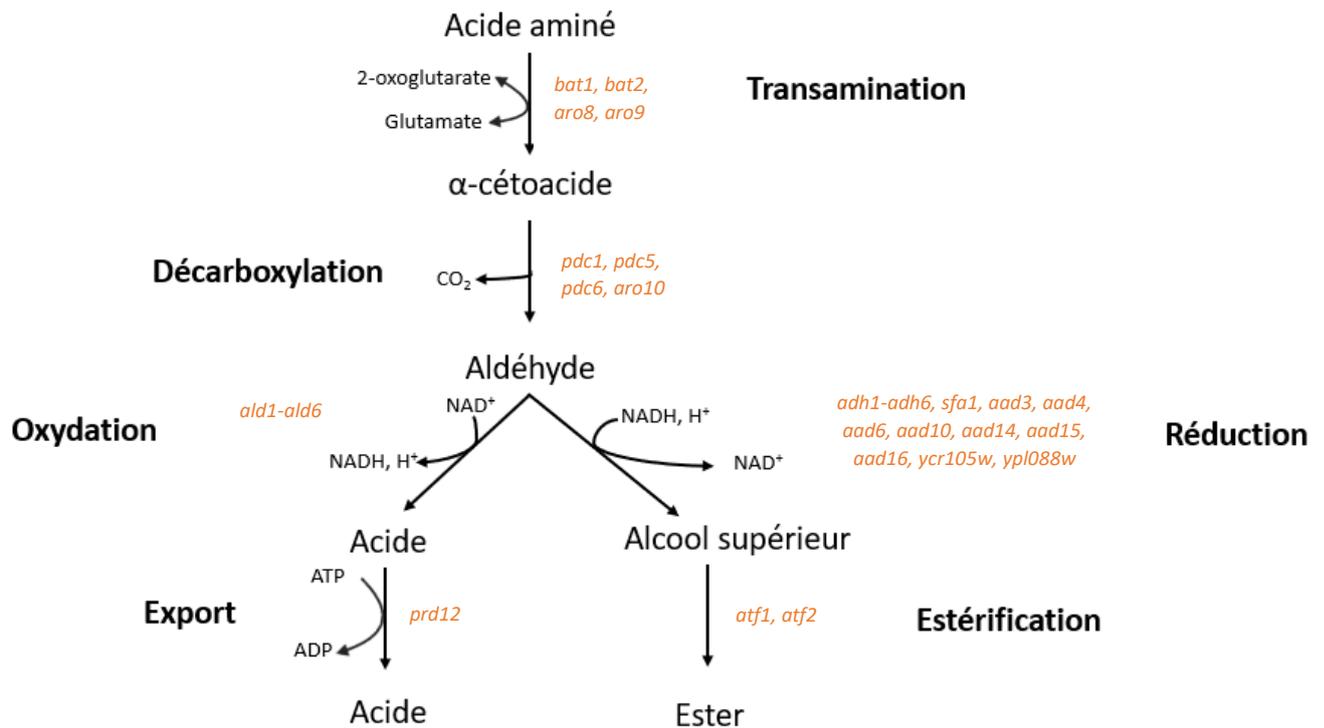
molécules de pyruvate par oxydation du glucose (**Figure 1**). Cette voie fournit l'énergie sous forme d'ATP et des équivalents réducteurs sous forme de NADH, tous deux nécessaires à la croissance en anaérobiose. La majorité du pyruvate est convertie en acétaldéhyde, lui-même principalement réduit en éthanol par la fermentation alcoolique (**Figure 1**) (0,47 g d'éthanol/g de sucre). L'autre partie de l'acétaldéhyde est convertie en acétate et en acétyl-CoenzymeA (ACoA), intervenant notamment pour la synthèse d'acides gras et d'esters (**Figure 2**). Le reste du pyruvate intègre le cycle de Krebs (**Figure 1**). En fermentation alcoolique, les enzymes du cycle de Krebs sont soumises à une répression catabolique par le glucose. Le cycle se divise alors en deux branches permettant la production de succinate, dont deux tiers proviennent de la branche réductrice. La branche oxydative permet la synthèse d' $\alpha$ -cétoglutarate, principalement en phase de croissance. Enfin, une partie du carbone initial sert à la synthèse de glycérol (**Figure 1**). Ceci permet de régénérer du  $\text{NAD}^+$  quand la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol n'est pas suffisante. Il peut ensuite servir de précurseur pour la synthèse de triglycérides et limite le stress osmotique dû aux hautes teneurs en sucre en début de fermentation.<sup>2,19,23</sup>

## **B. Caractérisation de la fermentation : cinétique fermentaire et arômes**

La souche de levure, la composition du moût de raisin et le mode de conduite de la fermentation sont essentiels. Le déroulement de la fermentation résulte de l'interaction de ces trois facteurs, ce qui a des conséquences au niveau de la cinétique et de la synthèse d'arômes.<sup>15</sup>

### 1. Le suivi de la cinétique fermentaire

Le suivi de l'activité fermentaire, exprimée en vitesse de dégagement de  $\text{CO}_2$  ( $d\text{CO}_2/dt$ ), permet de mettre en évidence les trois phases technologiques de la fermentation (**Figure 3**).<sup>15</sup> La fermentation débute par une phase de latence durant laquelle les levures s'acclimatent à leur environnement. Les conditions de fermentation (température, taux d'inoculation, ...) peuvent allonger sa durée de quelques heures à plusieurs jours. L'activité fermentaire est alors très faible, le milieu se sature progressivement en  $\text{CO}_2$  (environ 1,5 g/L) et très peu de nutriments sont consommés.<sup>13,19</sup> Puis, commence la phase exponentielle de croissance qui permet d'atteindre la population maximale qui varie en fonction des moûts (généralement entre 50 et 250.10<sup>6</sup> cellules/mL).<sup>1,19</sup> Cette phase permet de consommer environ un tiers du sucre initial et d'atteindre la vitesse de fermentation maximale ( $v_{\text{max}}$ ). La multiplication cellulaire se stoppe au bout de 3 à 6 jours, lors de l'épuisement de certains nutriments (azote assimilable, lipides ou vitamines).<sup>13,19</sup> Débute alors la phase stationnaire où la population cellulaire reste à son niveau maximal. Au cours de cette phase, l'activité fermentaire diminue graduellement jusqu'à



**Figure 4.** Synthèse des alcools supérieurs par la voie d'Ehrlich chez *S. cerevisiae* (Adaptée de <sup>6</sup>).

Le catabolisme des acides aminés à chaînes ramifiées (tels que la leucine, la valine et l'isoleucine), aromatiques (tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane) et des acides aminés contenant des atomes de soufre (la méthionine) aboutit à la formation d'acides et d'alcools supérieurs. La voie d'Ehrlich est composée de trois étapes, débutant par une transamination, puis une décarboxylation et se terminant soit par une réduction (pour les alcools supérieurs) ou par une oxydation pour les acides. Abréviations : *aad3/4/6/10/14/15/16* : Aryle-alcool déshydrogénase putative ; *adh1-6* : Alcool déshydrogénase ; *ald1-6* : Aldéhyde déshydrogénase ; *atf1/2* : Alcool O-acétyltransférase ; *aro8/9/10* : Transaminase d'acides aminés aromatiques ; *bat1/2* : Aminotransférase d'acide aminés à chaînes branchées ; *pdc1/5/6* : Pyruvate décarboxylase ; *prd12* : transporteur à cassette liant l'ATP ; *sfa1* : S-(hydroxyméthyl)glutathione déshydrogénase ; *ycr105w* : Alcool déshydrogénase NADPH-dépendante ; *ypl088w* : non caractérisé.

épuisement des sucres, en raison de l'accumulation d'éthanol (inhibition des transporteurs d'hexoses et augmentation de la perméabilité membranaire).<sup>13,19</sup>

## 2. Les arômes fermentaires

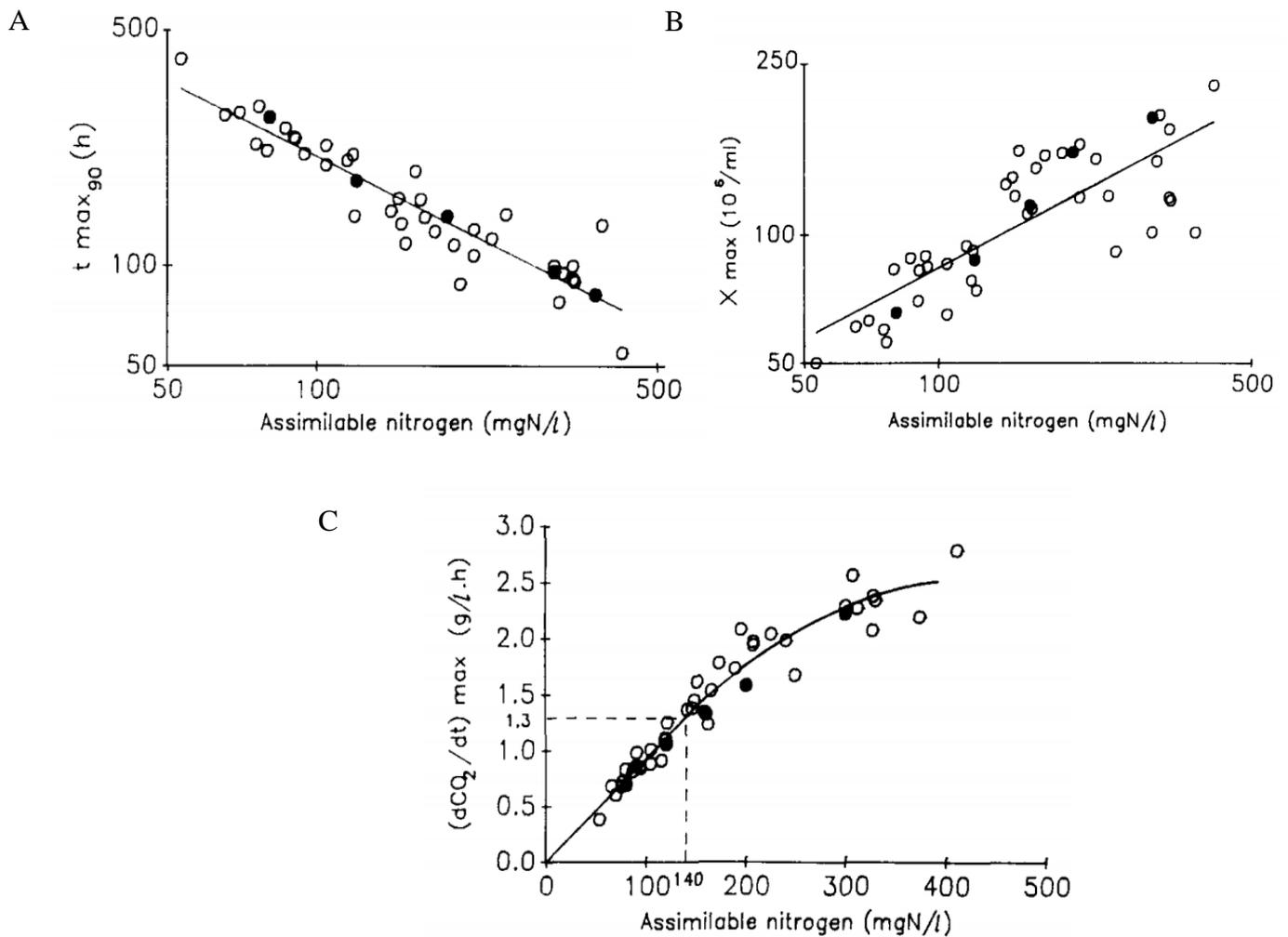
Les arômes fermentaires sont des molécules volatiles synthétisées par les levures au cours de la fermentation alcoolique, essentiels aux caractéristiques organoleptiques du vin.<sup>10</sup> Les conditions de fermentation telles que la température, la souche utilisée ou encore la teneur en azote assimilable du moût font varier leur nature et leur concentration.<sup>14,19</sup>

### 2.1 Les alcools supérieurs

Les alcools supérieurs sont des arômes fermentaires qui en concentration appropriée (inférieure à 300 mg/L) peuvent apporter une complexité aromatique bénéfique au vin. La voie d'Ehrlich permet leur synthèse à partir d'un acide aminé. Elle débute par la transamination d'un acide aminé en  $\alpha$ -cétoacide, qui est ensuite transformé en aldéhyde par des décarboxylases (différents en fonction de l'acide aminé initial) (**Figure 4**). Puis l'aldéhyde obtenu est oxydé en acide ou réduit en alcool supérieur selon l'état énergétique de la cellule : la branche réductrice consomme un NADH et celle oxydative le régénère.<sup>5,6,20</sup> L'équilibre redox est alors assuré et la synthèse d'alcools supérieurs protégerait la cellule de l'accumulation nocive d'aldéhydes.<sup>5,18</sup> Les alcools supérieurs peuvent également être synthétisés *de novo* par le métabolisme carboné central (MCC) (**Figure 2**), permettant la synthèse même après épuisement des ressources en azote assimilable (à l'exception du propanol provenant majoritairement de la voie d'Ehrlich).<sup>6,19</sup>

### 2.2 Les esters

Les arômes fermentaires de type ester se divisent en deux classes, les esters d'éthyle et les esters d'acétate. Ces composés très actifs sur le plan aromatique, donnent lieu à des arômes fruités et fruités/ floraux respectivement mais peuvent à trop forte concentration être néfastes (l'acétate d'éthyle peut par exemple apporter des notes de solvant).<sup>23</sup> La synthèse des esters d'acétate débute après la synthèse des alcools supérieurs. Elle nécessite la réaction d'un alcool supérieur avec un ACoA, ce qui permettrait de limiter l'accumulation de cétoacides toxiques. Les esters d'éthyle résultent de la réaction d'un acyl-CoA avec de l'éthanol. Ils serviraient entre autres d'agents de dispersion des levures dans la nature, d'analogues aux acides gras de la membrane plasmique et permettraient de régénérer le coenzyme A (pour les esters en général).<sup>6,18,19</sup>



**Figure 5. Impact de la quantité initiale d'azote sur la cinétique de fermentation.<sup>1</sup>**

En A est représenté l'impact de la quantité initiale d'azote sur la durée de la fermentation. Plus la quantité initiale d'azote est élevée, plus la durée de la fermentation est courte. En B, le graphique représente l'impact de la quantité initiale d'azote sur la concentration cellulaire maximale. Cette concentration augmente avec la quantité initiale d'azote dans le moût de raisin. Enfin, en C est présenté l'effet de la concentration initiale d'azote assimilable sur la vitesse maximale de production de CO<sub>2</sub>. Toutes ces données sont obtenues pour des fermentations réalisées à 24°C. Les points noirs correspondent aux fermentations réalisées sur moût synthétique et les ronds blancs aux fermentations réalisées sur moût naturel.

## C. Effet du moût de raisin sur la fermentation alcoolique

La souche de levure joue un rôle majeur dans la vinification mais la composition du moût de raisin est également importante. Il contient entre 150 et 260 g/L de sucre (fructose et glucose en mélange équimolaire), présente un pH acide (entre 2,9 et 3,8) et des taux d'O<sub>2</sub> très faibles (quasi-anaérobiose). Le moût de raisin est constitué d'azote, de minéraux, de vitamines et de lipides, éléments essentiels à la survie et à la croissance de la levure. Leur concentration dépend de multiples facteurs comme la variété de raisin ou encore la composition du sol. Il est parfois nécessaire de compléter les moûts avec des lipides ou de l'azote pour éviter des fermentations lentes, languissantes ou bloquées.<sup>15,18,19</sup>

### 1. Effet de l'azote sur la fermentation alcoolique

Les acides aminés et l'azote ammoniacal constituent les sources d'azote assimilables par les levures. Leur quantité initiale dans le moût de raisin impacte la durée de fermentation, la biomasse maximale produite et le  $v_{max}$ . Plus elles sont élevées plus la fermentation sera courte et le  $v_{max}$  élevé (**Figure 5**). Il est généralement admis que 120 à 130 mg N/L sont nécessaires au bon déroulement de la fermentation.<sup>1</sup> Enfin, la production d'arômes fermentaires est également influencée par la teneur en azote. La synthèse des esters augmente par exemple avec la concentration initiale d'azote.<sup>21</sup>

### 2. Effet des lipides sur la fermentation alcoolique

La composition de la paroi et de la membrane cellulaire varie fortement en aérobiose et en anaérobiose. En anaérobiose, la synthèse d'acides gras insaturés et d'ergostérols est inhibée ; cela peut conduire à des fermentations incomplètes car lentes ou bloquées, surtout en présence de hautes teneurs en azote. Les levures doivent alors importer les stérols et les acides gras insaturés de leur milieu. Pour cela, il est possible d'ajouter des particules solides de raisin afin de fournir des phytostérols ( $\beta$ -sitostérol, campestérol et stigmastérol) et des acides gras (acide palmitique, acide oléique et acide  $\alpha$ -linoléique) aux levures. L'absorption de ces phytostérols en anaérobiose permet de compenser les carences en lipides, augmentant alors la viabilité des levures en fin de fermentation.<sup>16</sup> Il est aussi possible d'oxygéner les moûts de raisin durant les premiers jours de fermentation afin de favoriser la synthèse de ces lipides.<sup>22</sup>

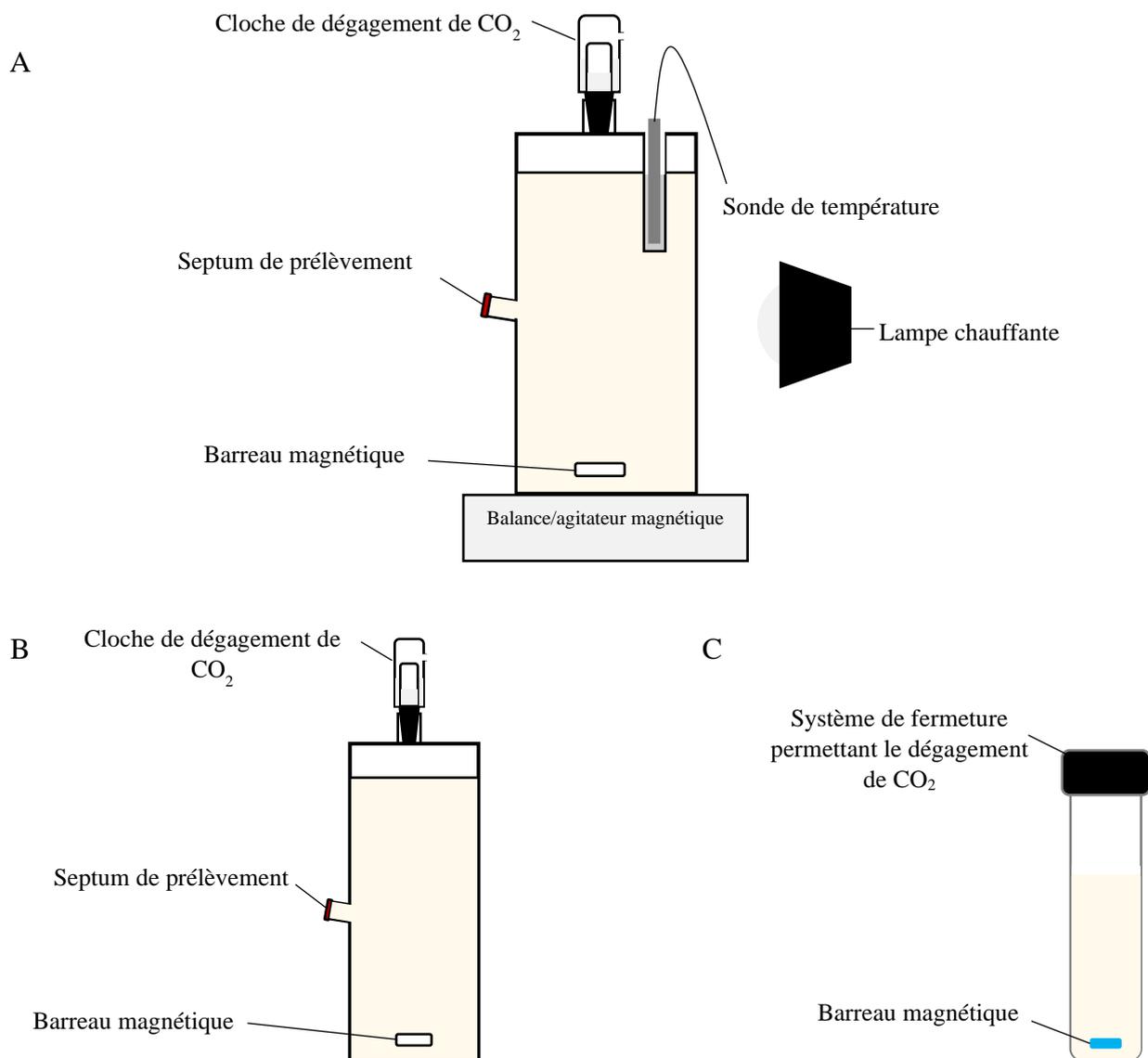
## D. Choix de l'échelle de fermentation

Le choix de l'échelle de fermentation reste complexe car il dépend des objectifs, des modalités et des considérations pratiques (coût de l'expérience, ...). Les fermentations à partir de 10 L



sont principalement destinées aux phases pilotes et industrielles, nécessitant de grands volumes pour les analyses chimiques et sensorielles. Les fermentations en petits volumes (15 mL à 10 L) sont utilisées pour évaluer au plus tôt des changements dans les pratiques viticoles et œnologiques.<sup>15</sup> Ces volumes permettent de réaliser des études plus complètes avec des réplicats, des modalités multiples, du suivi en ligne et cela même avec des quantités de raisin restreintes. Cependant, le passage en plus petit volume peut causer des problèmes de reproductibilité et d'incohérence par rapport aux pratiques « réelles » de la filière, notamment au niveau de la gestion de l'oxygène.<sup>7</sup> Il reste alors à déterminer jusqu'à quel niveau il faut se rapprocher des conditions réelles (caves) et quelle échelle privilégier pour quel questionnement. Est-il par exemple possible d'évaluer les performances des nouvelles variétés de raisin avec des fermentations à petite échelle, avant la mise sur le marché et donc avec très peu de quantité ?<sup>15</sup>

Actuellement l'UMR SPO de Montpellier dispose de plusieurs outils permettant de mettre en œuvre des fermentations en milieu liquide à des échelles allant de 15 mL à 2 L. Parmi ces outils, le robot de fermentation haut débit PhenOFerm permet de réaliser 96 fermentations en 250 mL ou 360 en 15 mL. Il permet de mettre en place des plans expérimentaux comportant un nombre élevé d'expériences (utilisé notamment pour le screening de souches). A ce jour aucune évaluation précise de la représentativité et de la reproductibilité de cet outil n'a encore été réalisée. L'objectif du stage est alors de comparer ces deux échelles avec une échelle de référence (1 L) et de réaliser en parallèle une étude bibliographique. La partie bibliographique, par la synthèse d'interviews de professionnels et de bibliographies, se focalise sur l'impact du changement d'échelle et sur le choix de l'échelle de fermentation en fonction du questionnement scientifique. La partie expérimentale a elle pour objectif d'évaluer l'impact du changement d'échelle par comparaison de l'échelle de référence (1 L) avec les échelles haut débit de 15 et 250 mL. En complément du suivi en ligne de la cinétique fermentaire, différentes méthodes de caractérisation du procédé fermentaire sont utilisées : comptage cellulaire, mesure de la viabilité, dosage de métabolites du MCC et d'arômes fermentaires. Les limites de détection du robot PhenOFerm sont déterminées par comparaison de ces paramètres sur différentes conditions de fermentation.



**Figure 6. Schémas des dispositifs de fermentation mis en place à l'échelle de 15 mL, 250 mL et 1 L.**

Les dispositifs de fermentation utilisés à l'échelle de 1 L, 250 mL et 15 mL sont représentés en A, B et C respectivement. Afin d'assurer la sortie du CO<sub>2</sub> produit lors de la fermentation alcoolique tout en maintenant l'anaérobiose, les fermenteurs sont équipés d'une cloche remplie d'eau (1 L et 250 mL) ou d'un dispositif de fermeture (15 mL). Les fermenteurs de 250 mL et de 1 L disposent également de septums de prélèvement pour les analyses en cours de fermentation. Pour les échelles haut débit (15 et 250 mL), des racks à agitation magnétique intégrée sont utilisés pour maintenir le milieu homogène. A l'échelle de 1 L, le fermenteur est placé sur une balance à agitation magnétique intégrée (la perte de poids est proportionnelle au CO<sub>2</sub> libéré). Enfin, la température du milieu est maintenue constante à l'aide d'une pièce climatisée et d'une sonde de température couplée à une lampe chauffante pour l'échelle de 1 L et par une pièce thermostatée pour les autres échelles.

## II. Matériels et méthodes

- **Interviews**

Une liste de questions préétablie par les encadrants a été modifiée au début du stage et au fil des interviews (**Figure S1**). Les questions ont été construites par rapport aux questionnements du laboratoire d'accueil et des réponses données au cours de l'enquête. Les mêmes questions ont été posées à une dizaine de professionnels du secteur privé et public. Les réponses ont ensuite été intégrées dans un rapport bibliographique externe au rapport de stage.

- **Souche de levure utilisée**

La levure *S. cerevisiae* SC1 provenant de la société Lallemand (Blagnac, France) est utilisée sous forme de levures sèches actives (LSA). Les fermenteurs sontensemencés à 5 g/hL, à l'aide de LSA préalablement réhydratées dans une solution d'eau glucosée (50 g/L) pendant 20 minutes à 37°C.

- **Milieux utilisés**

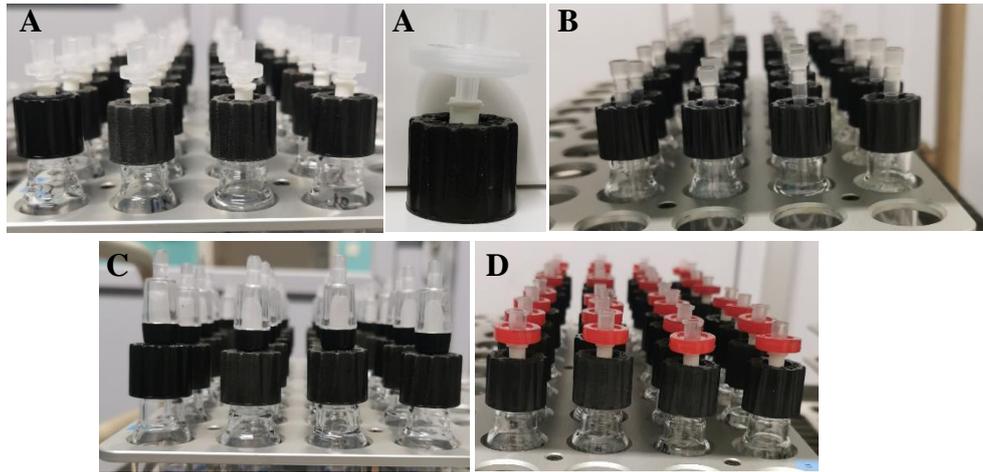
Les fermentations sont réalisées à l'aide d'un moût synthétique (MS) reproduisant les caractéristiques moyennes d'un moût de raisin naturel.<sup>1</sup> Trois MS différents au niveau de leur teneur en azote et en stérol sont utilisés : MS100 à 15 mg/L de phytostérol, MS400 à 1 mg/L de phytostérol et MS400 à 15 mg/L de phytostérol (MS<sub>n</sub>, où n indique la teneur en azote (en mgN/L)). La composition de base du MS est décrite dans les **Tableaux S1 à S6**. Il contient 200 g/L de sucre (glucose et fructose en concentration équimolaire). La source d'azote assimilable est un mélange d'ammonium et d'acides aminés (n'incluant ni l'atome d'azote de la proline (non assimilable en anaérobiose) ni un des quatre atomes de l'arginine) (**Tableau S2**). Le pH du milieu final est ajusté à 3,3 à l'aide d'une solution de soude. Les MS sont stockés à -20°C et sont mis à température avant lancement de la fermentation alcoolique. Avant ensemencement, une solution de facteurs anaérobies est ajoutée (**Tableau S4**).<sup>17</sup>

- **Fermentation à trois échelles : 15 mL, 250 mL et 1 L**

Les dispositifs de fermentation (MS, fermenteur, cloche remplie d'eau et système d'aération) (**Figure 6**) sont pasteurisés à vapeur fluente pendant 10 minutes à 100°C (pour les échelles de 250 mL et 1 L) ou 3 minutes à 100°C (pour l'échelle de 15 mL) avant inoculation de la souche.

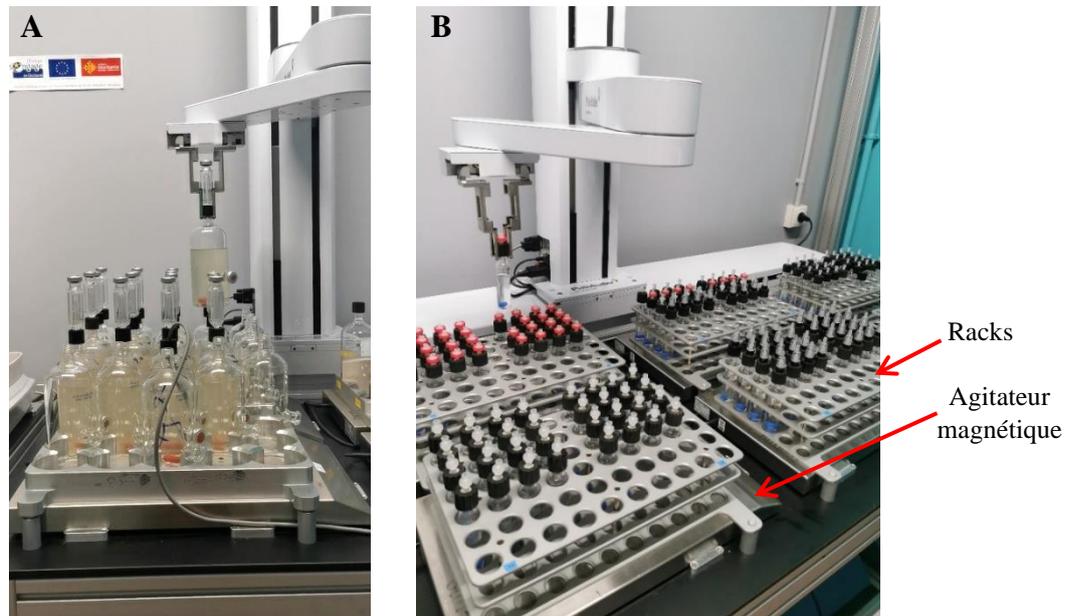
### Fermentation à l'échelle de 1 L

Les fermenteurs de 1 L en verre (**Figure 6A**) sont équipés d'une cloche remplie d'eau (permettant le dégagement de CO<sub>2</sub> et le maintien de l'anaérobiose), d'un septum (prélèvement d'échantillons sans entrée d'O<sub>2</sub>) et d'un barreau aimanté. La pasteurisation entraîne une



**Figure 7. Photographies des différents systèmes de fermeture testés.**

Le dispositif en A est un filtre seringue en cellulose, plusieurs diamètres sont proposés (4 et 15 mm). Le dispositif utilisé actuellement (cône de pipette assurant la sortie du CO<sub>2</sub>) dans le laboratoire est présenté en B. Le dispositif présenté en C est un clapet anti-retour assurant la sortie de CO<sub>2</sub> tout en maintenant l'anaérobiose. Enfin, en D un filtre en cellulose certifié HPLC, de 15 mm de diamètre est présenté.



**Figure 8. Photographies du système haut débit PhenOFerm.**

Le dispositif PhenOFerm dispose d'un bras robotisé permettant de peser les fermenteurs toutes les 2 h (pour les 15 mL) ou toutes les 30 minutes (pour les 250 mL). En (A) est présentée la disposition pour des fermenteurs de 250 mL, soit 96 fermentations en simultanée. En (B) est présentée la disposition pour des fermenteurs de 15 mL, soit 360 fermentations. L'acquisition du poids est ensuite transférée au logiciel Alfis.

désoxygénation du milieu. Les fermenteurs sont alors saturés en O<sub>2</sub> à l'aide d'air comprimé (stérilement) pendant 20 minutes, rétablissant une concentration en oxygène dissous à l'équilibre avec l'air. Les fermenteurs sont ensuite placés dans une pièce climatisée (entre 14 et 18°C). La température du milieu est maintenue constante à 22°C à l'aide d'une sonde mesurant la température de la phase liquide toutes les cinq secondes. Une lampe infrarouge est déclenchée en cas de baisse de la température en dessous de la température consigne (condition isotherme).

#### Fermentation à l'échelle de 250 mL

Des fermenteurs équipés d'une cloche remplie d'eau et d'un septum de prélèvement sont remplis de 250 mL de MS (**Figure 6B**). Après saturation en O<sub>2</sub> pendant 20 minutes, les fermenteurs sont placés dans des racks disposés sur des plaques agitantes (250 rpm), maintenant le milieu homogène (**Figure 8A**). La température du milieu est maintenue constante à 22°C à l'aide d'une sonde de température déclenchant l'activation d'une climatisation statique ou du chauffage selon les besoins (condition isotherme).

#### Fermentation à l'échelle de 15 mL

Des tubes en verre (**Figure 6C**) équipés d'un système de fermeture (**Figure 7**) permettant la libération du CO<sub>2</sub> sont remplis avec 15 mL de MS. Le milieu est saturé en O<sub>2</sub> par agitation des tubes pendant 2 h (la moitié des fermenteurs n'est pas agitée pour tester la gestion de l'oxygénation). Le milieu est homogénéisé (à 250 ou 130 rpm pour déterminer l'agitation la plus adaptée) et maintenu à 22°C de la même façon qu'en 250 mL (**Figure 8B**).

- **Suivi de la cinétique fermentaire**

L'avancement de la fermentation est suivi par mesure de la perte de poids résultant du dégagement du CO<sub>2</sub> produit par la fermentation alcoolique. Toutes les 20 minutes, des balances individuelles (au 1/1000<sup>e</sup> de gramme) réalisent une acquisition du poids des fermenteurs de 1 L. Pour les fermenteurs de 15 et 250 mL, un bras robotisé (PhenOFerm) vient réaliser une pesée sur une balance toutes les 2h pour les tubes de 15 mL et 30 minutes pour les fermenteurs de 250 mL (**Figure 8**). Les mesures de poids sont transmises par les balances à un logiciel d'acquisition développé en interne sous LabVIEW. Ceci permet de générer la vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub> et le cumul de CO<sub>2</sub> dégagé. Ces données sont stockées et accessibles sur la base de données Alfis.

Les analyses qui suivent sont réalisées à 80% de l'avancement (arômes fermentaires et viabilité) ou en fin de fermentation (concentration cellulaire et métabolites carbonés).



- **Mesure de la population levurienne**

Comptage cellulaire par un compteur Coulter

Le compteur électronique de particules (Counter Multisizer 4e, Beckam Coulter, Fullerton, Californie, USA) utilise un champ électrique pour compter les cellules dans une solution conductrice. L'échantillon est d'abord dilué (au 1/2500) dans un électrolyte (Isoton II® (Beckam-Coulter, Margency, France)) pour obtenir une concentration cellulaire située dans la gamme de mesure de l'appareil (entre 20 000 et 80 000 cellules/mL). Les cellules agglomérées sont ensuite séparées par sonication (30 secondes à 10 W) et comptées lors de leur passage dans l'orifice de la sonde du compteur électronique (100 µm). Le passage des cellules non-conductrices dans l'orifice entraîne un changement de résistance électrique, proportionnel au volume de particules déplacées. La concentration cellulaire (cellules/mL) est déterminée comme étant le nombre de pics de tension (changement de résistance en fonction du temps).

Viabilité cellulaire par cytométrie en flux

La viabilité cellulaire est déterminée par cytométrie en flux (C6 Accuri, St Ives, Cambs, Royaume-Uni). Pour cela, les surnageants sont dilués dans une solution saline tamponnée au phosphate (1X) afin d'obtenir des concentrations cellulaires entre 5 et 10.10<sup>6</sup> cellules/mL. Les cellules mortes, présentant des défauts de perméabilité membranaire, sont détectées par l'entrée d'un colorant d'acide nucléique fluorescent lipophile, l'iodure de propidium (IP) (5 µL d'IP à 100 mg/mL dans 500 µL d'échantillon centrifugé et dilué). Ce fluorochrome émet une fluorescence rouge (575 nm) lorsqu'il est lié à l'ADN, mise en évidence par excitation par un laser de 488 nm. Ceci permet de calculer la viabilité comme étant le pourcentage de cellules intactes et fragiles parmi l'ensemble des cellules.

- **Dosage des arômes fermentaires**

Le dosage des arômes fermentaires (alcools supérieurs et esters) est réalisé par chromatographie en phase gazeuse (Hewlett Packard 6890, Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA) couplée à une spectrométrie de masse (HP 5973, Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA). Afin de s'affranchir de toutes variations liées à la préparation des échantillons, une solution d'étalons internes deutérés (10µL dans 5 mL d'échantillon) est ajoutée après élimination des cellules par centrifugation. Elle contient 100 pg/mL des composés suivants : butanoate d'éthyl-*d*5, octanoate d'éthyl-*d*5, acide butyrique-*d*7, décanoate d'éthyle-*d*5 et phényléthanol-*d*4. Après deux extractions liquide-liquide avec du dichlorométhane des composés volatils, les phases organiques sont récupérées par centrifugation, puis séchées avec



du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous flux d'azote (volume de 0,5 mL). L'échantillon à analyser est ensuite vaporisé à 250°C dans l'injecteur, puis transporté par le gaz vecteur (hélium) à travers la colonne contenant la phase stationnaire (silice). En sortie de colonne, les arômes fermentaires sont détectés à l'aide d'un spectromètre de masse. Les spectres de masse obtenus sont analysés à l'aide du logiciel HP G1701DA ChemStation et la quantification des arômes fermentaires est réalisée à l'aide d'une courbe de calibration linéaire dans la gamme de concentration étudiée.

- **Détermination de la concentration de métabolites carbonés**

La concentration en sucre et alcool (glucose, fructose, glycérol et éthanol) et en acides organiques (pyruvate, succinate, malate, lactate et acétate) est déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Le surnageant de l'échantillon de fermentation à analyser est dilué au 1/6<sup>e</sup> dans une solution d'acide sulfurique à 0,005 N dégazée (cette même solution sert de phase mobile). L'échantillon dilué (25 µL) est injecté dans l'injecteur puis envoyé par la phase mobile dans une colonne de séparation échangeuse d'anions (résine styrène-divinylbenzène) thermostatée à 60°C. En sortie de colonne, la concentration en acides organiques est déterminée à l'aide d'un spectromètre UV mesurant l'absorbance à 210 nm alors que les autres composés sont détectés à l'aide d'un réfractomètre RID. Les chromatogrammes résultants sont traités à l'aide du logiciel Agilent EZChrom et les concentrations calculées par un étalonnage externe.

- **Analyses statistiques**

L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel de traitement statistique R, version 4.1.3 et du package `alfisStatUtilR`. Les paramètres principaux décrivant les cinétiques fermentaires sont calculés après lissage des cinétiques par le package `locfit`. Afin d'obtenir une vue générale de l'effet échelle sur la cinétique fermentaire, une analyse en composantes principales (ACP) est réalisée à l'aide du package `FactoMineR`. Enfin, un test de Tukey est réalisé pour déterminer s'il existe des différences significatives entre les moyennes ( $p$ -value < 0,05) des concentrations cellulaires, des viabilités, des rendements d'arômes, des rendements de métabolites carbonés et des paramètres cinétiques des trois échelles.



### III. Résultats et discussion

L'objectif est de déterminer l'impact du changement d'échelle et sur quels paramètres choisir l'échelle de fermentation de travail. Pour cela une étude bibliographique et une évaluation expérimentale du système de fermentation haut débit PhenOFerm ont été menées en parallèle.

#### A. Les paramètres déterminant le choix de l'échelle de fermentation de travail

Le choix de l'échelle de fermentation est complexe et dépend de nombreux paramètres. L'étude bibliographique (non présentée dans le rapport au vu de son nombre de pages) s'est alors intéressée aux différentes échelles de fermentation mises en œuvre dans le secteur et leur potentiel à répondre à des problématiques spécifiques. Pour élargir le panel d'échelles de fermentation, l'enquête se réfère à des références bibliographiques et à des interviews réalisées auprès de professionnels du secteur (le questionnaire est présenté en **Figure S1**). En général, les échelles de fermentation sont utilisées de manière complémentaire avec une échelle de référence et des échelles de tailles plus variées pour répondre à des problématiques spécifiques. Bien que l'échelle de référence varie en fonction des problématiques d'étude, il est admis, par une grande partie des professionnels interrogés, que l'échelle de 1 hL, de par ses caractéristiques ergonomiques (facilement manipulable, volume suffisant pour représenter la réalité en cave) et économiques (limitant la quantité de raisin tout en permettant une large gamme d'analyses), se positionne comme échelle de référence. Les fermentations en faible volume (inférieur à 10 L) sont majoritairement utilisées dans les laboratoires pour des essais œnologiques s'intéressant aux processus de fermentation. Elles permettent de réaliser des études plus complètes par la possibilité de réaliser des répliqués, de tester de multiples modalités et cela même avec des quantités de raisin restreintes. Des analyses plus fines peuvent être réalisées par la compatibilité de ces volumes fermentaires avec des capteurs de suivi en ligne. Néanmoins, la miniaturisation de la vinification est associée à un risque d'oxygénation pouvant éloigner des conditions réelles. Les essais pilotes sont alors réalisés à partir de 1 hL pour se rapprocher des conditions de cave et disposer de quantités de vin suffisantes pour les analyses sensorielles et chimiques finales.

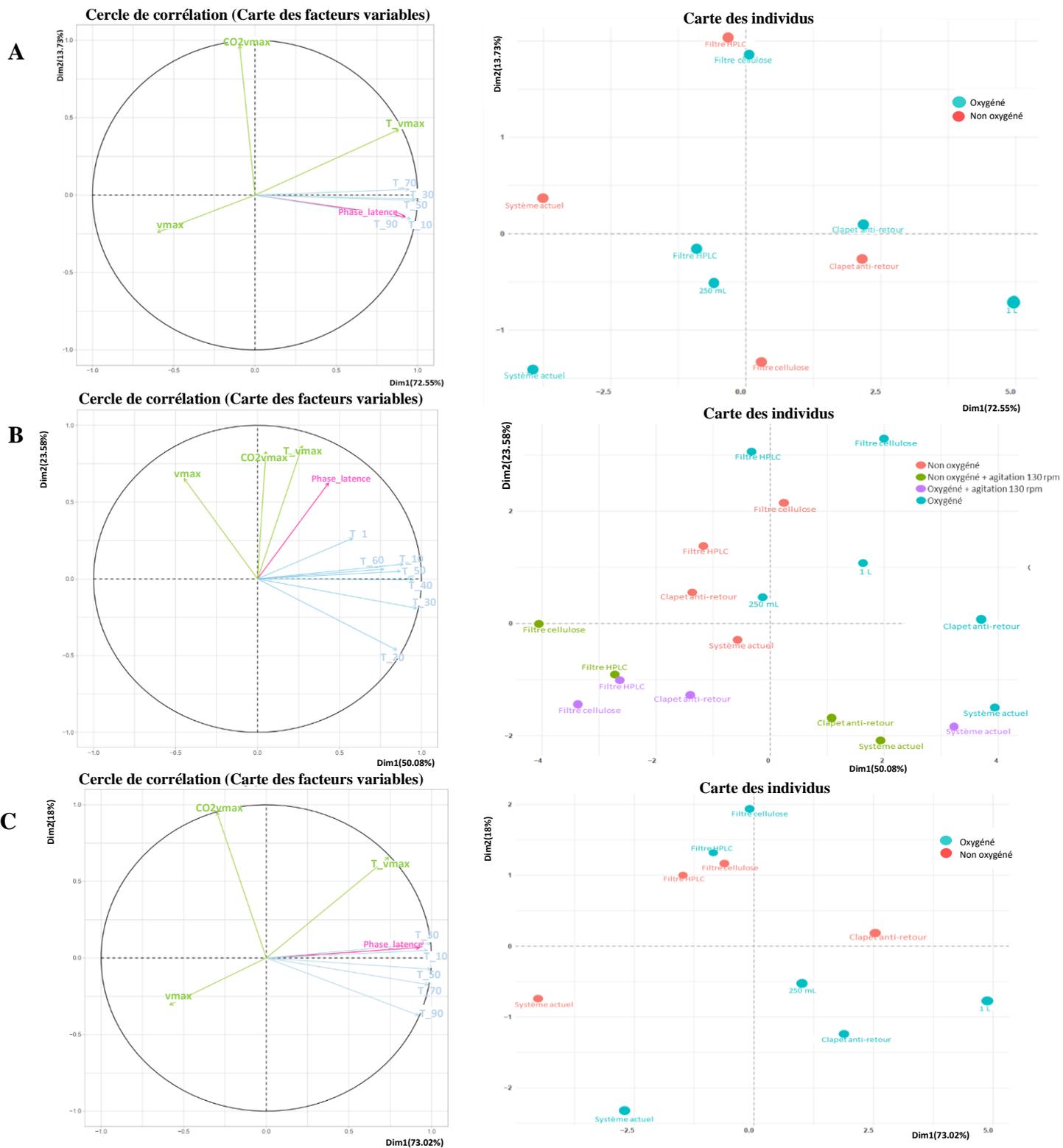
Le choix de l'échelle de fermentation se fait alors principalement en fonction des questionnements et de l'objectif d'étude. Les contraintes pratiques, ergonomiques, la disponibilité de la matière première et du matériel, le nombre de modalités à mettre en place et les financements ont également une grande influence.



## B. Evaluation des protocoles de vinification haut débit du robot de fermentation PhenOFerm (échelle de 15 et 250 mL)

Afin de juger dans quelle mesure le robot de fermentation PhenOFerm peut être utilisé en tant qu'outil de fermentation haut débit, les protocoles de vinification en 15 et 250 mL sont évalués. Une comparaison avec l'échelle de référence de 1 L est alors réalisée au niveau de la cinétique fermentaire, de la population cellulaire et du métabolisme. Les protocoles seront validés après mesure de l'impact du changement d'échelle et vérification de l'absence d'artefact sur les données produites par rapport à l'échelle de référence. Pour évaluer au mieux les deux échelles de fermentation haut débit, trois conditions de fermentations couramment retrouvées en cave sont testées. Une première condition, dite optimale, utilise un moût synthétique contenant l'ensemble des éléments nécessaires au bon déroulement de la fermentation, soit une haute concentration en lipides et en azote (MS400 avec 15 mg/L de phytostérol). Une deuxième condition teste le cas des fermentations languissantes dues à un défaut en azote avec un MS100 avec 15 mg/L de phytostérol. Enfin, le cas des carences lipidiques est testé avec un MS400 dont la concentration en phytostérols est diminuée à 1 mg/L. Ce panel de milieux de fermentation permet d'identifier les limites de détection des différents équipements.

Jusqu'à présent un système muni d'un cône en plastique était utilisé en 15 mL, mais ce dernier trop long, touchait le milieu et avait tendance à s'humidifier, faussant alors les résultats (**Figure 7B**). Il est donc nécessaire de trouver un dispositif de fermeture (**Figure 7**) assurant le maintien de l'anaérobiose tout en permettant le dégagement de CO<sub>2</sub> vers l'extérieur. Le dispositif actuel, trois filtres seringues en cellulose de diamètre différent (4 à 15 mm) et un dispositif de clapet anti-retour (permet le passage du CO<sub>2</sub> tout en empêchant l'entrée d'O<sub>2</sub>) (**Figure 7**) sont alors comparés. Un essai préliminaire concentré sur la préhension des fermenteurs par le bras robotisé a permis d'éliminer le dispositif de filtre seringues en cellulose de 15 mm de diamètre. Ce dernier empêche la fermeture des pinces et donc la pesée des fermenteurs. La hauteur des clapets anti-retour impose la disposition des fermenteurs en quinconce, diminuant de moitié le nombre maximal de fermentations (180 fermentations). Il est aussi nécessaire d'évaluer la gestion de l'O<sub>2</sub> avant inoculation pour assurer une saturation représentative des 1 L. La moitié des fermenteurs en 15 mL est alors oxygéné avant l'inoculation (ils seront ensuite désignés par le nom du système de fermeture suivi du terme oxygéné ou non oxygéné). L'évaluation permet alors également de déterminer le protocole fermentaire à appliquer en 15 mL (système de fermeture et gestion de l'oxygène).



**Figure 9. Analyse en composantes principales des principaux paramètres cinétiques.**

L'ACP présente l'impact du changement d'échelle sur plusieurs paramètres cinétiques. Les systèmes de fermeture utilisés en 15 mL sont représentés en fonction de leur type et de l'oxygénation initiale. Les fermentations sont conduites en MS400 + 15 mg/L de phytostérol (A), MS100 (B) ou MS400 + 1mg/L de phytostérol (C), à 22°C avec la souche SC1 et aux échelles de 1 L (n=3), 15 et de 250 mL (n=4). Abréviations : CO<sub>2</sub>v<sub>max</sub> : CO<sub>2</sub> atteint au v<sub>max</sub> ; v<sub>max</sub> : vitesse fermentaire maximale de la levure SC1 ; T<sub>vmax</sub> : Temps en heure pour atteindre le v<sub>max</sub> ; Phase\_latence : durée de la phase de latence ; T<sub>X</sub>: durée pour atteindre x g/L de CO<sub>2</sub>.

## 1. Evaluation des protocoles de vinification haut débit et impact du changement d'échelle

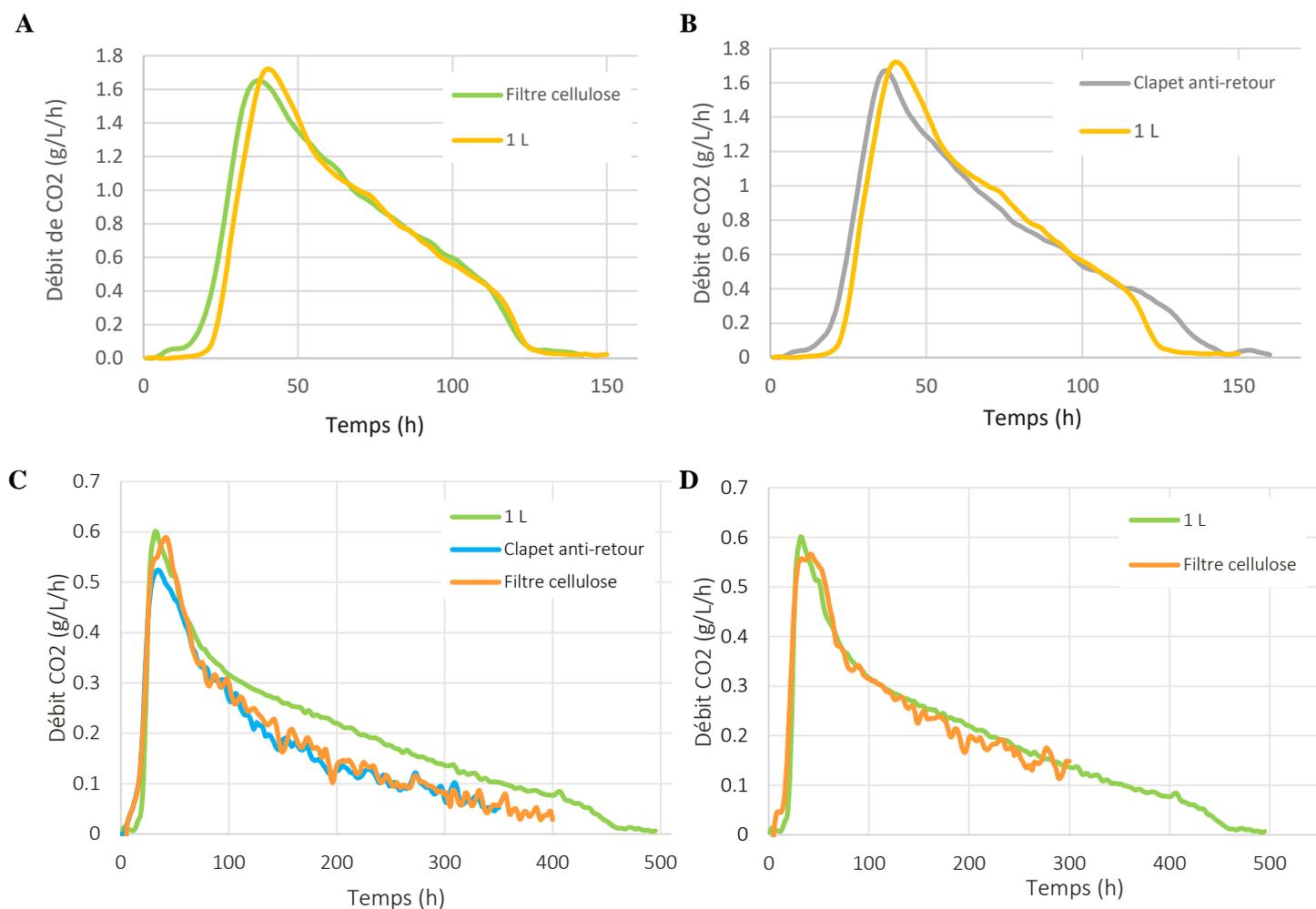
Au vu du nombre de données (3 paramètres étudiés sur 188 fermentations), les résultats suivants sont la moyenne des réplicats (écarts-types faibles et cohérents avec les paramètres étudiés).

### • Effets de l'échelle de fermentation sur la cinétique fermentaire

Afin de déterminer l'impact du changement d'échelle au niveau de la cinétique fermentaire, la répétabilité et la représentativité des échelles haut débit sont évaluées. Pour obtenir une vision globale de la cinétique, le  $v_{\max}$ , le  $\text{CO}_2$  et temps de fermentation associés au  $v_{\max}$ , la phase de latence, les temps de fermentation permettant d'atteindre X g/L de  $\text{CO}_2$  (les plus représentatifs) et la fin de fermentation (pour plus de précision, le T90 est considéré comme représentatif de la fin du procédé) sont comparés. Les temps de fermentation présentés pour le milieu pauvre en azote seront plus précoces car les fermentations en 15 mL n'ont pas pu être menées à leur terme (en raison du planning du robot PhenOFerm).

L'ensemble des réplicats des échelles de 250 mL et 1 L présente une haute répétabilité (voir **Figure S2**), avec des écarts-types inférieurs à 5% pour la majorité des paramètres cinétiques, à l'exception des vitesses de début et de fin de fermentation. A l'échelle de 15 mL, les écarts-types sont inférieurs à 15% pour la majorité des paramètres cinétiques mesurés sur les meilleurs systèmes de fermeture. Ceci résulte de l'incertitude insérée par la quantité réelle de  $\text{CO}_2$  libérée (pour 90 g de  $\text{CO}_2$  libéré au cours d'une fermentation en 1 L, seulement 1,36 g est dégagé en 15 mL). Les résultats sont donc fiables en termes de répétabilité pour l'ensemble des échelles.

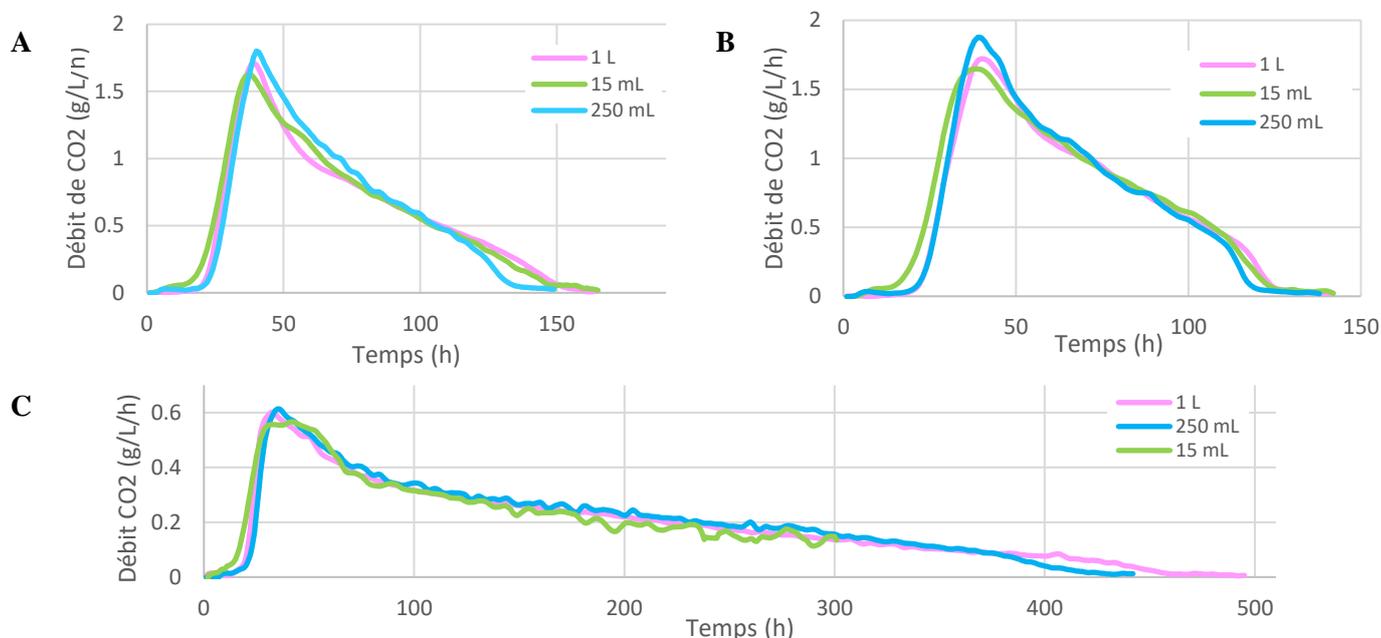
La représentativité est ensuite évaluée par comparaison de l'allure des cinétiques fermentaires et des différents paramètres cinétiques. Les expérimentations ayant été menées avec des milieux, des souches et des taux d'inoculation identiques, les cinétiques fermentaires doivent être similaires en absence d'effet de l'échelle. Des ACP sont réalisées pour déterminer les paramètres discriminant les différentes échelles et déterminer le système de fermeture optimal en 15 mL. Elles permettent de condenser les informations fournies par l'ensemble des variables cinétiques étudiées pour chaque échelle de fermentation en un nombre réduit de composantes, avec une perte minimale d'informations. En **Figure 9A**, les deux premières composantes expliquent 86,3% de la variance et séparent l'échelle de 1 L, le clapet anti-retour et le filtre cellulose non oxygénés des autres systèmes de fermeture en 15 mL. Bien que le clapet anti-retour non oxygéné se démarque sur l'ACP (**Figure 9A**), la cinétique fermentaire obtenue avec le filtre cellulose non oxygéné (et sa position dans l'ACP à proximité en 1 L) oriente le choix vers ce système de fermeture (**Figure 10**). En effet, les fermentations obtenues avec un clapet



**Figure 10. Choix du système de fermeture à partir des cinétiques fermentaires.**

Les cinétiques fermentaires ( $dCO_2/dt$ ) obtenues en 1 L et 15 mL sur MS400 + 15 mg/L de phytostérol sont comparées en A et B. Les cinétiques fermentaires obtenues sur MS100 + 15 mg/L de phytostérol sont comparées en C et D. Toutes les fermentations sont menées à 22°C avec la souche SC1. L'ensemble des fermentations est initialement oxygéné à l'exception de l'échelle 15 mL en A, B et D. Au vu des écarts-types <10% pour la majorité des paramètres cinétiques, les cinétiques fermentaires sont représentés comme la moyenne des réplicats (n=3 en 1L et n=4 en 15 mL).





**Figure 11. Comparaison des cinétiques fermentaires obtenues en 15mL, 250 mL et en 1 L.**

Les cinétiques de fermentation sont représentées comme étant la vitesse de dégagement du CO<sub>2</sub> en fonction du temps. Les fermentations sont réalisées avec du MS400 + 1 mg/L (A) ou 15 mg/L de phytostérol (B) ou du MS100 (C) dans des fermenteurs de 1 L et 250 mL, à 22°C avec la souche SC1. Les cinétiques sont représentées comme la moyenne des réplicats (n=4 en 15 et 250 mL et n=3 en 1 L). Les écarts-types ne sont pas représentés car ils sont inférieurs à 10%.

**Tableau 1. Effets de l'échelle sur la cinétique fermentaire.**

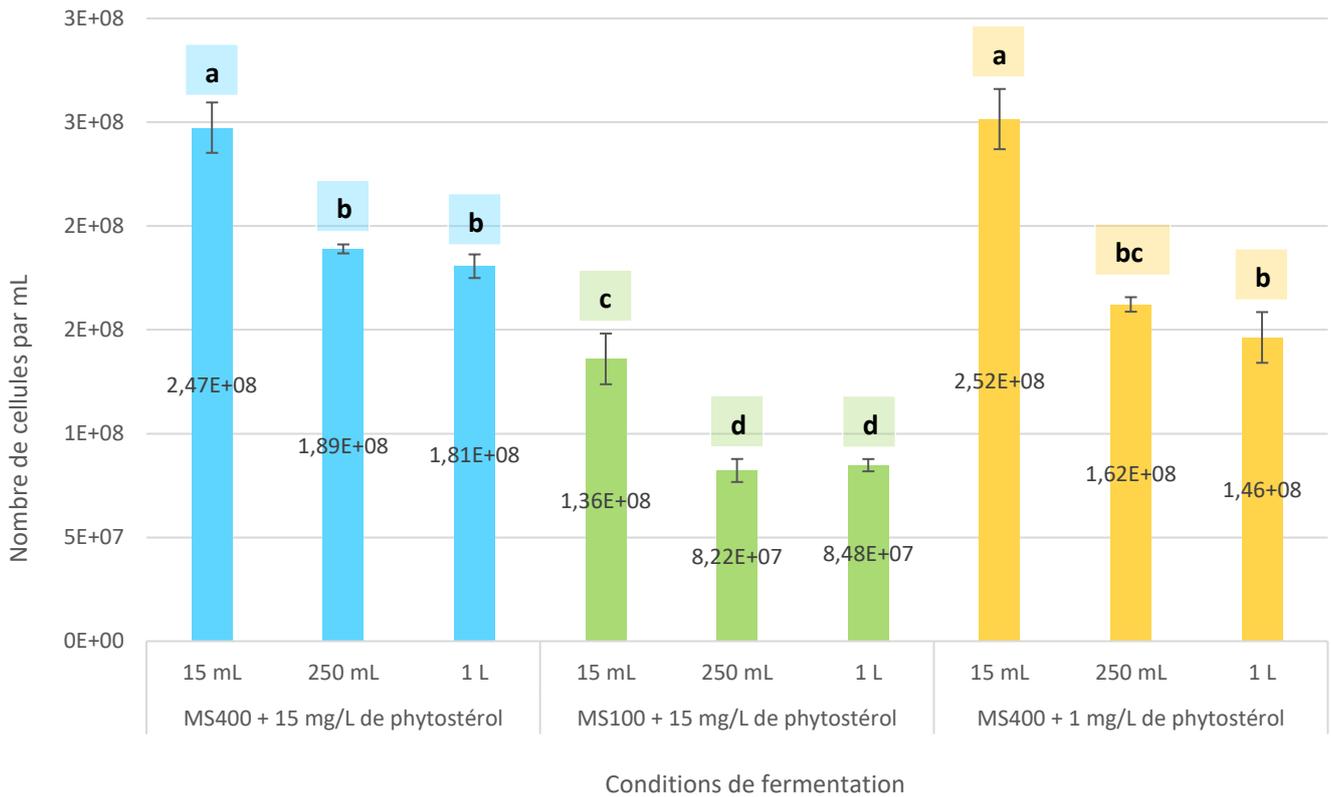
Paramètres cinétiques	MS400 + 15 mg/L de phytostérol		MS400 + 1 mg/L de phytostérol		MS100 + 15 mg/L de phytostérol	
	15 mL	250 mL	15 mL	250 mL	15 mL	250 mL
Phase de latence	NS	NS	NS	NS	-	-
Temps pour atteindre 1 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	-	-	-	NS	NS
Temps pour atteindre 10 g/L de CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	NS	NS
Temps pour atteindre 20 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Temps pour atteindre 30 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	-	NS	-	NS	NS
Temps pour atteindre 40 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	NS	NS	-	NS	NS
Temps pour atteindre 50 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Temps pour atteindre 60 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Temps pour atteindre 70 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	NS	-	-	NA	-
Temps pour atteindre 80 g/L de CO <sub>2</sub>	NS	NS	-	-	NA	-
Temps pour atteindre 90 g/L de CO <sub>2</sub>	-	-	NS	NS	NA	-
v <sub>max</sub>	NS	+	NS	+	NS	NS
CO <sub>2</sub> atteint au v <sub>max</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Temps pour atteindre le v <sub>max</sub>	NS	NS	NS	-	NS	NS

Tableau présentant les principaux paramètres cinétiques permettant de discriminer les différentes échelles de fermentation. Un effet significatif ( $p$ -value <0,05) est présenté en bleu lorsqu'il est à l'origine d'une diminution du paramètre et en jaune lorsqu'il est à l'origine d'une augmentation. L'absence d'effet significatif ( $p$ -value >0,05) est représentée par l'acronyme NS (Non significatif). La significativité de l'effet est estimée à l'aide d'un test de Tukey comparant l'échelle de 1 L à l'échelle de 15 mL (système de fermeture sélectionné) ou de 250 mL.

anti-retour se terminent avec un décalage par rapport à l'échelle de 1 L (**Figure 10**). Pour le milieu pauvre en azote (**Figure 9B**), les deux premières composantes expliquent 73,7% de la variance et séparent l'échelle de 1 L, les clapets anti-retour oxygénés et les filtres de cellulose (oxygénés et non oxygénés). La meilleure superposition des cinétiques (**Figure 10**) et la plus grande proximité du filtre de cellulose non oxygéné oriente une fois de plus le choix vers ce système. Enfin, en **Figure 9C** les deux premières dimensions expliquent 91% de la variance et séparent les échelles de 1 L, 250 mL et le clapet anti-retour oxygéné des autres systèmes de fermeture. Ceci oriente le choix vers ce système de fermeture lors d'une carence en stérol.

Pour l'ensemble des milieux testés, les cinétiques obtenues avec les systèmes de fermeture retenus en 15 mL démontrent de très bonnes superpositions, à l'exception de phases de latence plus courtes (**Figure 9** et **Figure 11**). Bien que non significative ( $p\text{-value} > 0,05$ ) pour les milieux riches en azote, la différence observable au niveau des cinétiques témoigne d'une modification légère de la phase de latence (**Figure 11** et **Tableau 1**). Cette différence est imputable au volume d'inoculation très faible à cette échelle (7,5  $\mu\text{L}$ ), rendant l'obtention d'une inoculation constante et reproductible de l'échelle 1 L plus difficile. Le **Tableau 1** indique que les fermentations en 15 mL se terminent plus rapidement que celles en 1 L (temps pour atteindre 80 ou 90 g/L de  $\text{CO}_2$  plus faibles) ce qui n'est pas cohérent avec les cinétiques observées (**Figure 11**). Ceci peut s'expliquer par une surestimation du taux de  $\text{CO}_2$  en 15 mL en raison d'une plus grande incertitude à cette échelle. La perte de  $\text{CO}_2$  se compte en mg à cette échelle pouvant expliquer les différences au niveau des temps de fermentation (**Tableau 1**). La **Figure 11** met en avant une autre limite de cette échelle, pour des fermentations lentes (en C), la perte de poids est tellement faible que les cinétiques sont très bruitées par rapport à des cinétiques plus rapides (en A ou B, où la perte de poids est plus importante). Malgré que la maîtrise initiale de l'oxygène soit importante (au vu des systèmes de fermeture sélectionnés), peu de différences sont observées entre les individus oxygénés et non oxygénés, en accord avec une reprise d'oxygénation en 15 mL en cours de fermentation.

Les fermentations menées en 250 mL ne sont pas séparées par les deux composantes en **Figure 9A et B** mais restent à proximité de l'échelle 1 L. Elles se distinguent par des temps de fermentation plus courts (position de l'individu dans les ACP en **Figure 9**). Les fermentations sont significativement plus rapides en début et fin de fermentation (**Tableau 1**). Elles se terminent en moyenne 70 h plus tôt pour le milieu pauvre en azote et 20 h avant pour les autres milieux (**Figure 11**). Bien que moins probant pour le milieu pauvre en azote, les temps de fermentation permettant d'atteindre les différentes concentrations en  $\text{CO}_2$  sont corrélés négativement au  $v_{\text{max}}$  (**Figure 9**). Ce qui est en accord avec le fait que le  $v_{\text{max}}$  est



**Figure 12. Impact du changement d'échelle sur la population cellulaire.**

Estimation de l'effet échelle au niveau de la population de levures par comparaison des concentrations cellulaires obtenues aux différentes échelles. Les comptages cellulaires sont réalisés sur des échantillons de fin de fermentation des trois échelles testées (15 mL, 250 mL et 1 L) et pour les trois conditions testées lors de l'évaluation (MS400 + 1 mg/L de phytostérol, MS400 + 15 mg/L de phytostérol et MS100). Les résultats présentés sont la moyenne des triplicats pour l'échelle de 1 L et de quadruplicats pour l'échelle de 250 mL et de 15 mL. Les écarts-types sont représentés par des barres d'erreur. La présence d'une même lettre indique l'absence de différence significative entre deux modalités (test de Tukey).

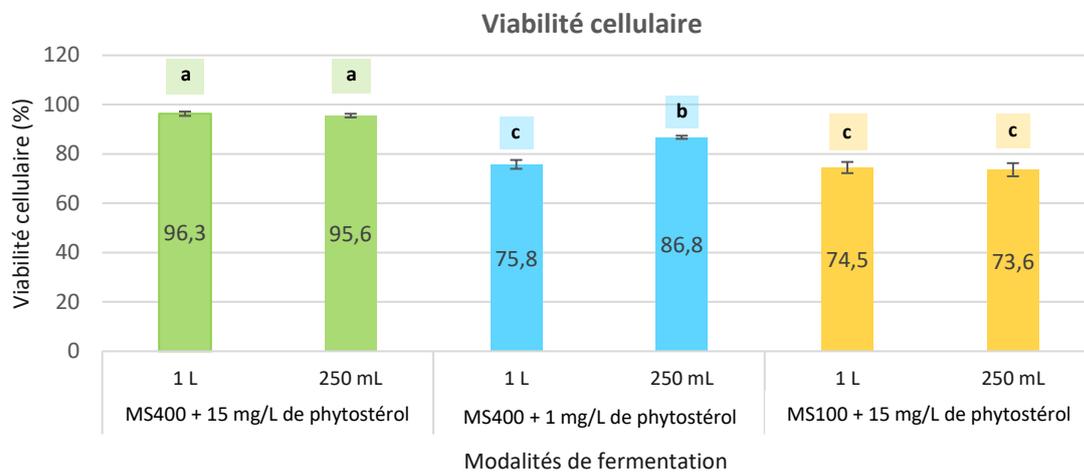
significativement plus important en 250 mL (**Tableau 1**) pour les milieux riches en azote. A titre d'exemple, en condition optimale un  $v_{\max}$  de 1,86 est obtenu en 250 mL contre seulement 1,73 en 1 L. Ceci peut être expliqué par une disponibilité initiale en oxygène plus importante, due à une agitation et oxygénation non proportionnelle au volume fermentaire. Ceci permet une croissance cellulaire plus rapide et plus importante et par conséquent une consommation plus courte du sucre et un  $v_{\max}$  plus élevé.<sup>7</sup> Malgré ces différences, les cinétiques fermentaires montrent une bonne superposition et cela pour l'ensemble des milieux testés (**Figure 11**).

En général, l'échelle de 1 L est à l'origine de fermentations plus lentes de la phase de latence à la fin de la fermentation (temps corrélés entre eux en **Figure 9**). En effet, l'échelle de 1 L se positionne à l'extrémité des flèches correspondant aux temps de fermentation en **Figure 9**.

Ainsi, pour une meilleure représentativité de l'échelle de 1 L, il semble nécessaire d'orienter la conduite de la fermentation en 15 mL (choix du système de fermeture et gestion de l'oxygène) en fonction du milieu. Il s'agit donc de la première limite de cette échelle. Pour des milieux pauvres en stérol, il sera préférable d'utiliser des clapets anti-retour (voir partie C) alors que des filtres seringue en cellulose pourront être utilisés le reste du temps. L'oxygénation préalable des fermenteurs est à proscrire lors de l'utilisation d'un filtre cellulose, au risque d'entraîner une trop forte oxygénation (non reproductible de celle appliquée en 1 L). La cinétique fermentaire est le paramètre le plus important à maîtriser en fermentation. Le reste du rapport se concentrera alors seulement sur les systèmes de fermeture en 15 mL présentant les cinétiques les plus proches des 1 L : clapet anti-retour oxygéné et filtre seringue en cellulose non oxygéné. Il est important de noter que cette première comparaison démontre que les microvinifications (15 et 250 mL) ne peuvent pas reproduire à l'identique l'échelle de 1 L mais s'en rapprochent.

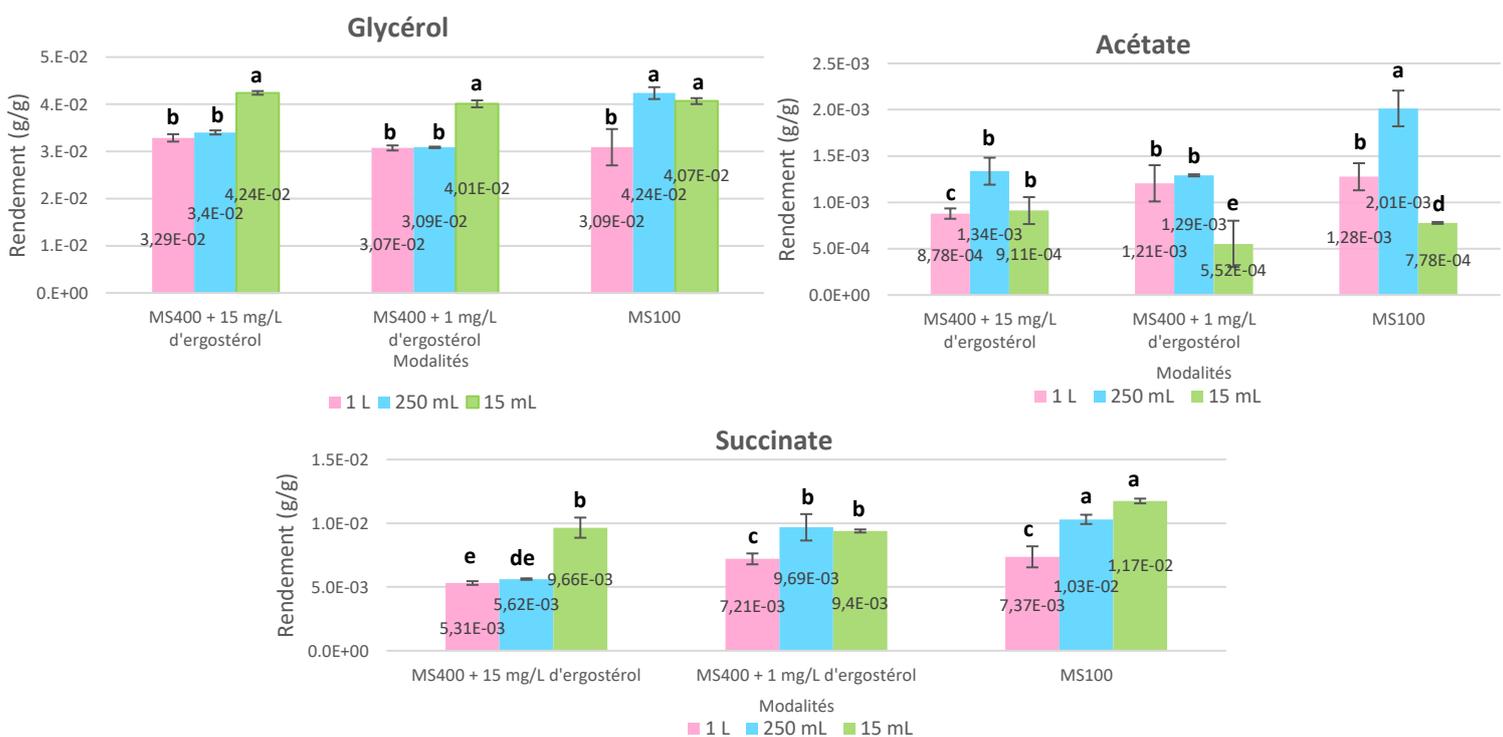
- **Evaluation de l'effet du changement d'échelle sur la population levurienne**

Pour compléter l'étude des différentes échelles, le nombre de cellules et la viabilité sont comparés. Les volumes fermentaires disponibles en 15 mL ne permettant pas de mesurer la viabilité cellulaire, seule le nombre de cellules est analysé. Pour l'ensemble des milieux testés, seul l'échelle de 250 mL présente une population cellulaire semblable à celle retrouvée en 1 L ( $p$ -value>0,05) (**Figure 12**). L'échelle de 15 mL présente un nombre de cellules 22 à 37% fois plus important que les fermenteurs de 1 L en fonction des modalités (**Figure 12**). L'obtention de  $v_{\max}$  similaires en 15 mL et 1 L (**Tableau 1**) (par exemple, pour le milieu pauvre en stérol, un  $v_{\max}$  de 1,66 est obtenu en 15 mL contre 1,7 en 1 L) semble indiquer que la hausse du nombre de cellules en 15 mL n'est « qu'apparente ». Ceci pourrait résulter d'un rapport volume



**Figure 13. Impact du changement d'échelle sur la viabilité cellulaire.**

L'effet du changement d'échelle est déterminé au niveau de la viabilité pour les échelles de 250 mL et de 1 L. L'histogramme présente la viabilité cellulaire (%) en fonction des milieux fermentaires. Les écarts-types sont représentés par des barres d'erreur. La présence d'une même lettre indique l'absence de différence significative entre deux échelles (test de Tukey).



**Figure 14. Impact du changement d'échelle sur les rendements des principaux métabolites carbonés issus du métabolisme carboné central (en g/g<sub>sucrose consommé</sub>).**

Les rendements des métabolites carbonés du MCC de *S. cerevisiae* (glycérol, acétate et succinate) sont calculés à partir des concentrations moyennes (réplicats) obtenus pour chaque milieu (MS100, MS400 15 ou 1 mg/L de phytostérol). L'échelle de 15 mL est présentée en vert, celle de 250 mL en bleu et celle de 1 L en rose. Les lettres différentes au-dessus des barres de l'histogramme indiquent des différences significatives entre les échelles (test de Tukey).

fermentaire/ vitesse d'agitation plus important en 15 mL, entraînant alors le cisaillement des amas cellulaires et donc une hausse du nombre de cellules « apparente » uniquement. Pour confirmer cette hypothèse, l'impact de l'agitation a été déterminé, lors d'une expérimentation complémentaire, comparant des fermentations menées sans et sous agitation (250 rpm). En absence d'agitation, la population levurienne passe de  $194.10^6$  à  $80.10^6$  cellules/mL, avec un écart de 59 % entre les deux conditions. L'ACP obtenue pour la modalité MS100 en **Figure 9C** démontre l'absence d'impact de l'agitation sur la cinétique fermentaire. Les fermentations agitées à 130 rpm et 250 rpm sont principalement séparées par la deuxième dimension qui n'explique 23,6% de la variabilité. Cette diminution de l'agitation permet de diminuer le nombre de cellules de seulement  $24.10^6$  cellules par mL en moyenne (résultats non présentés), soit encore  $27.10^6$  cellules de plus par rapport au 1 L. Il est donc nécessaire de déterminer une vitesse d'agitation évitant le cisaillement des amas cellulaires et la décantation des cellules sans perturber les échanges gazeux et donc la population cellulaire.

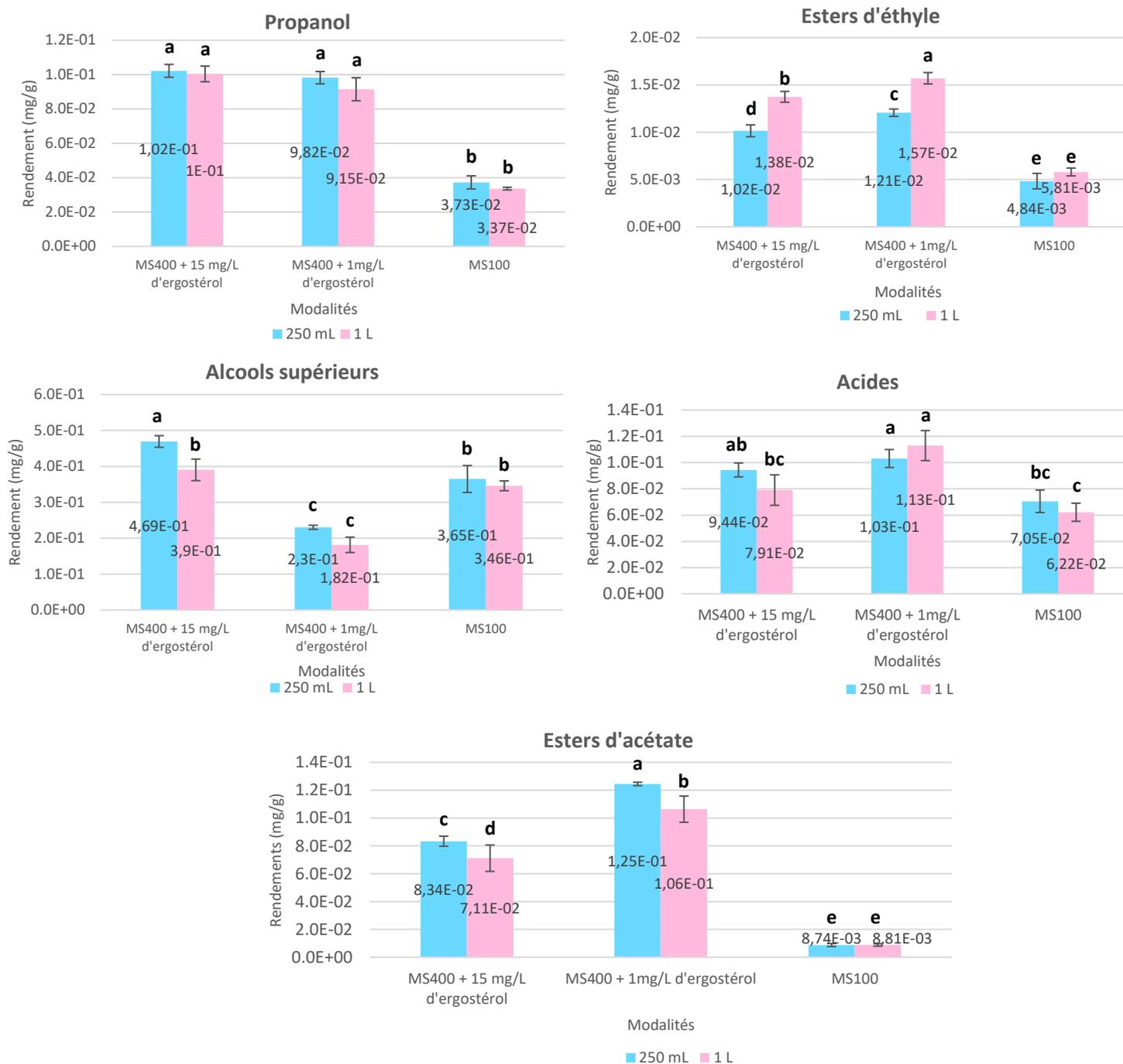
Les viabilités concordent très bien avec l'échelle de 1 L (écarts-types < 1% et  $p$ -value >0,05), à l'exception du milieu pauvre en stérol (**Figure 13**). L'augmentation de la viabilité de 75,8% en 1 L à 86,8% en 250 mL peut être expliquée par une oxygénation plus importante en 250 mL, à l'origine d'une population cellulaire moins sensible à l'éthanol car contenant plus de stérols.

Ainsi, le changement d'échelle ne semble pas impacter ou uniquement de manière « limitée » la population cellulaire au niveau de sa concentration et de sa viabilité. Les différences observées sont imputables à une oxygénation (en accord avec les précédentes conclusions obtenues en 250 mL) et/ou agitation plus importante aux échelles haut débit.

- **Effets de l'échelle de fermentation sur la production d'arômes fermentaires et de métabolites carbonés du métabolisme carboné central**

Les résultats précédents semblent indiquer une variation dans les conditions hydrodynamiques entre les échelles haut débit et l'échelle de référence. Les voies métaboliques de *S. cerevisiae* étant influencées par la gestion de l'aération initiale, il est nécessaire de vérifier l'impact du changement d'échelle au niveau du métabolisme. Le stage se focalise sur la production des trois principaux métabolites du MCC (acétate, glycérol et succinate) et sur les principales classes d'arômes fermentaires (alcools supérieurs, esters d'acétate, esters d'éthyle, acides et propanol).

Les rendements des métabolites carbonés ont été calculés pour l'ensemble des échelles et dispositifs de fermeture en 15 mL. Au vu des résultats obtenus pour les cinétiques, seuls les dispositifs retenus dans cette partie sont comparés au 1 L. Les résultats de la **Figure 14**

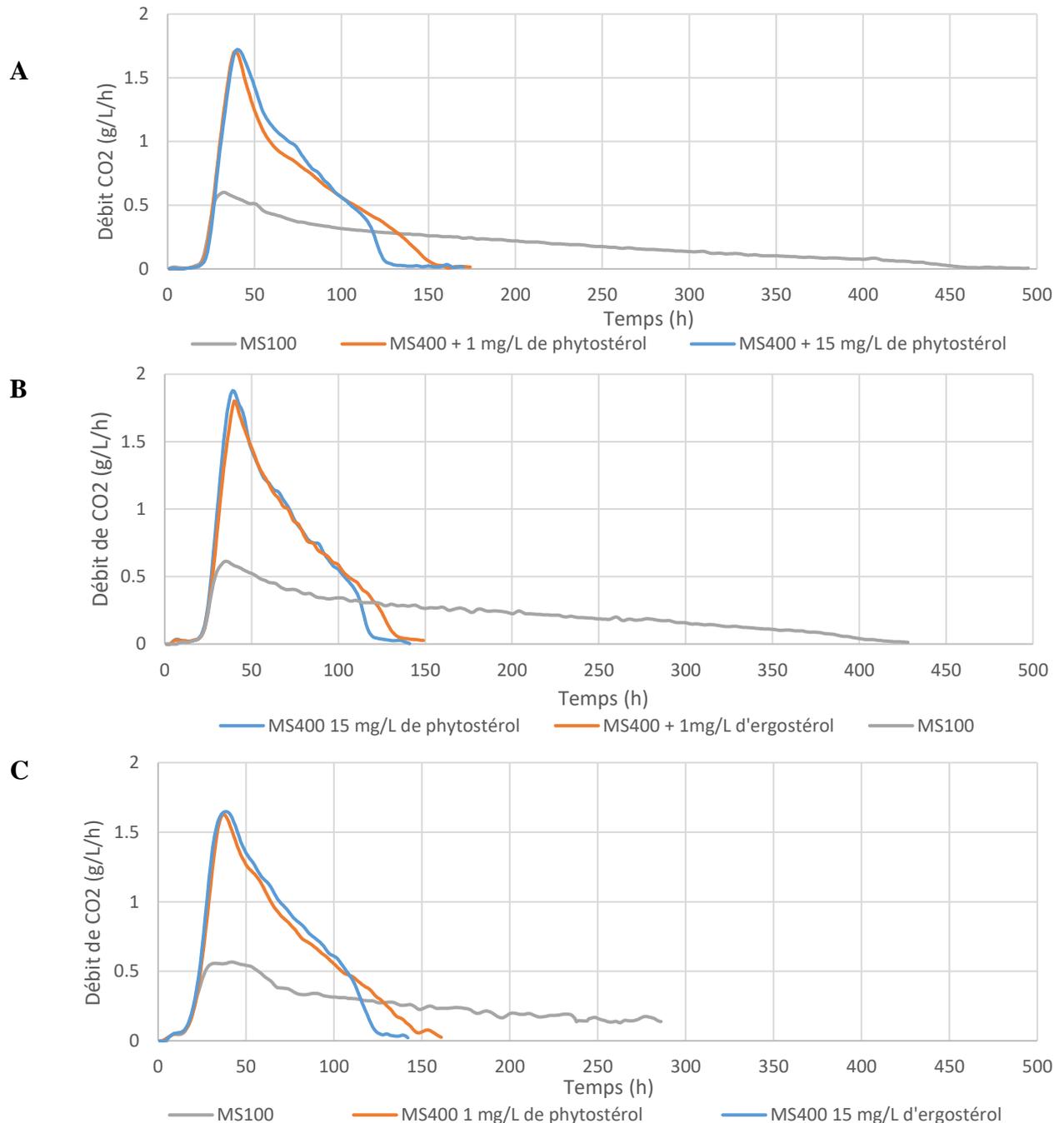


**Figure 15. Impact du changement d'échelle sur les rendements des principaux arômes fermentaires (en mg/g<sub>sucré consommé</sub>).**

Les rendements des principaux arômes fermentaires (propanol, alcools supérieurs, esters d'éthyle, esters d'acétate et acides) sont calculés à partir des concentrations moyennes (réplicats) obtenues à 80% de l'avancement de la fermentation. Les rendements sont calculés pour trois milieux : MS400 + 15 mg/L de phytostérol, MS100 et MS400 + 1 mg/L de phytostérol. L'échelle de 250 mL est présentée en bleu et celle de 1 L en orange. La présence d'une même lettre indique l'absence de différence significative entre deux échelles (test de Tukey).

démontrent un fort impact du changement d'échelle au niveau du MCC, variant en fonction de l'échelle au débit. Le passage à l'échelle de 250 mL affecte la production de succinate et de glycérol de manière similaire (à l'exception de la modalité pauvre en stérol) (**Figure 14**). En effet, pour le milieu pauvre en azote une augmentation significative du rendement en glycérol et succinate ( $p$ -value $<0,05$ ) est observée à l'échelle de 250 mL ( $7,4 \cdot 10^{-3}$  g/g et  $3,1 \cdot 10^{-2}$  g/g sont produits en 1 L contre  $1 \cdot 10^{-2}$  g/g et  $4,1 \cdot 10^{-2}$  g/g en 250 mL pour le succinate et le glycérol respectivement) (**Figure 14**). Pour la modalité optimale, les rendements des deux métabolites restent aussi dans les mêmes proportions, mais ne diffèrent pas de l'échelle de 1 L ( $p$ -value $>0,05$ ) (**Figure 14**). L'observation d'une hausse ou d'une baisse du glycérol et du succinate est en accord avec la bibliographie, notant un lien redox entre ces deux marqueurs du potentiel redox intracellulaire. La synthèse du succinate par la branche oxydative du cycle de Krebs aboutit à la production de NADH. Ce dernier peut être réoxydé lors de la biosynthèse du glycérol, permettant alors à la cellule de répondre aux contraintes redox.<sup>17</sup> L'augmentation significative de l'acétate en 250 mL pour les milieux riches en stérol ( $1,3 \cdot 10^{-3}$  g/g en 250 mL contre  $8,8 \cdot 10^{-4}$  en 1 L pour la modalité optimale et  $2 \cdot 10^{-3}$  en 250 mL contre  $1,3 \cdot 10^{-3}$  g/g en 1 L pour le milieu pauvre en azote, **Figure 14**) peut être expliquée par le catabolisme de l'excès d'acide gras (surproduit en raison d'une plus forte oxygénation) en ACoA qui est lui-même hydrolysé en acétate et en coenzyme A. Bien que les fermentations en 250 mL soient menées de façon à reproduire au mieux l'échelle de 1 L, la miniaturisation semble perturber la gestion des potentiels redox de la cellule avec un impact différenciel au niveau du NADPH et du NADH. Ces discordances peuvent être expliquées par une plus forte oxygénation en 250 mL. Les résultats obtenus à l'échelle de 15 mL sont plus difficiles à interpréter. L'agitation étant trop importante à cette échelle, il est possible que les forces de cisaillement induites impactent le métabolisme de la levure. Il serait donc nécessaire de mener des recherches plus approfondies pour en comprendre l'origine.

Au niveau du métabolisme secondaire, seules les échelles 250 mL et 1 L sont comparées. En effet, le volume de 15 mL est incompatible avec le dosage des arômes fermentaires. Les résultats sont présentés comme étant la somme des alcools supérieurs (à l'exception du propanol dont la synthèse ne suit pas le même modèle), des acides, des esters d'acétate et des esters d'éthyle, ces composés ayant des voies de biosynthèse communes. Au vu des résultats obtenus en **Figure 15** (et de la variation induite par l'extraction), l'effet échelle sur le métabolisme secondaire semble limité. Néanmoins, en 250 mL, les milieux riches en azote présentent une modification significative du ratio des esters (augmentation des esters d'acétate et diminution



**Figure 16. Prédominance de l'effet milieu sur l'effet échelle au niveau de la cinétique fermentaire.**

Comparaison des cinétiques fermentaires obtenues dans les mêmes conditions fermentaires à trois échelles différentes. Les fermentations sont réalisées avec du MS400 + 15 mg/L de phytostérol (orange) ou avec du MS400 + 1 mg/L de phytostérol (bleu) ou avec du MS100 + 15 mg/L de phytostérol, dans des fermenteurs de 1 L (A) ou de 250 mL (B) ou de 15 mL (C), à 22°C avec la souche SC1. Les cinétiques représentent la moyenne des réplicats (n=3 en 1 L et n=4 en 15 et 250 mL) car les écarts-types sont inférieurs à 10% pour la majorité des paramètres cinétiques.

des esters d'éthyle). Le rendement en alcools supérieurs est également significativement augmenté pour la modalité optimale (**Figure 15**). Les variations observées dans la composition aromatique sont probablement liées à une plus haute oxygénation des fermenteurs en 250 mL. En accord avec la bibliographie, la plus grande accumulation en alcools supérieurs et donc en esters d'acétate (dérivant des alcools supérieurs) résulte d'une oxygénation initiale plus importante qui stimule la croissance cellulaire ainsi que le métabolisme des sucres (prévaut sur la régulation négative de l'enzyme responsable de la formation d'esters d'acétate par les lipides et l'oxygène).<sup>22</sup> Un effet synergique de l'ajout de stérol en excès (15 mg/L de phytostérol) et d'oxygène (initialement plus important) est à l'origine d'une augmentation significative en alcools supérieurs.<sup>22</sup> Une modification dans le ratio des esters est également observée avec une diminution en esters d'éthyle (**Figure 15**) : l'oxygène inhibe la répression du complexe FAS et donc inhibe le relargage d'acides gras à moyenne chaîne et la production d'esters d'éthyle. Ainsi, les résultats haut débit obtenus au niveau du métabolisme sont difficilement transposables à l'échelle de 1 L, à l'exception de ceux du métabolisme secondaire. Ces résultats confirment une plus forte oxygénation en 250 mL et agitation en 15 mL. Ceci est reflété par des changements dans les ratios de production des différents métabolites carbonés et arômes fermentaires étudiés et donc la redistribution de certains flux métaboliques.

## 2. Prévalence de l'effet milieu sur l'effet échelle

Les différences obtenues au niveau des cinétiques fermentaires et du métabolisme démontrent l'impact du changement d'échelle. Néanmoins, l'ensemble des données collectées lors du stage démontre la prévalence de l'effet de la modalité (milieu de fermentation) sur l'effet échelle. Le classement entre les différents milieux reste identique à chaque échelle et cela même en absence de reproductibilité totale entre l'échelle de référence et celles haut débit (**Figure 16**).

L'utilisation d'un moût synthétique carencé en stérol (ici phytostérol) est toujours à l'origine d'un ralentissement des fermentations à environ 110h. Les stérols sont essentiels durant la fermentation alcoolique. Ils assurent la viabilité des levures, en lien avec la résistance au stress éthanol ou encore lors de l'épuisement en azote, par le maintien de la structure de la membrane plasmique.<sup>3</sup> Les cloches et le clapet anti-retour permettent de maintenir une anaérobiose stricte, évitant la production d'ergostérol par la levure par l'entrée d'O<sub>2</sub> qui compenserait la carence en phytostérol. Sur ce milieu de fermentation spécifique, l'oxygénation initiale ne permet pas de contrer la carence en stérol et de résister au stress de fin de fermentation (forte concentration en éthanol, ...). Ceci explique la diminution de la population levurienne (~ 30 millions de cellules en moins, **Figure 12**) et de la viabilité (la viabilité passe de 75,8 % à 96,3% en 1 L et de 86,8%

**Tableau 2. Tableau présentant les taux de variation entre la modalité optimale et la modalité carencée en stérol.**

Paramètres étudiés	1L		250 mL		15 mL		Taux de variation (%)
	MS100	MS400 +15 mg/L de phytostérol	MS100	MS400 +15 mg/L de phytostérol	MS100	MS400 +15 mg/L de phytostérol	
Phase de latence	25,7	28,35	22,4	26,3	22,2	25,9	-15%
T <sub>1g</sub> /L (h)	23,2	24,1	21,3	19	21	19,7	12%
T <sub>10g</sub> /L (h)	40,1	34	38,8	31,7	39	31,6	22%
T <sub>20g</sub> /L (h)	59,4	39,7	58,4	37,2	57,3	37,8	57%
T <sub>30g</sub> /L (h)	85,2	45,8	83,3	42,7	82,8	43,8	95%
T <sub>40g</sub> /L (h)	116,7	53,1	113,6	49,4	114,2	50,9	130%
T <sub>50g</sub> /L (h)	152,4	62	148,2	57,3	151,5	58,9	159%
T <sub>60g</sub> /L (h)	193,6	71,7	187,2	66,2	197,3	67,9	183%
T <sub>70g</sub> /L (h)	242,4	83,5	232,2	77,1	254,4	78,5	201%
T <sub>80g</sub> /L (h)	306,8	98,6	286,2	90,9			215%
T <sub>90g</sub> /L (h)	407,7	143,3	363	115,1			184%
V <sub>max</sub> (h)	0,6	1,74	0,6	1,86	0,59	1,7	-66%
T <sub>max</sub> (h)	32,1	38,7	32,2	36,4	38,7	35,8	-17%
CO <sub>2</sub> max (h)	5,3	18,1	6,1	18,6	9,8	16,8	-71%
CO <sub>2</sub> (h)	92,8	90,5	93,2	91,3			3%
Glycérol (g/g)	3,09E-02	3,29E-02	4,24E-02	3,4E-02			-6%
Acétate (g/g)	1,28E-03	8,78E-04	2,01E-03	1,34E-03			45%
Succinate (g/g)	7,37E-03	5,31E-03	1,03E-02	5,62E-03			39%
Propanol (mg/g)	3,37E-02	1E-01	3,73E-02	1,02E-01			-66%
Ester d'éthyle (mg/g)	5,81E-03	1,38E-02	4,84E-03	1,02E-02			-58%
Alcools supérieurs (mg/g)	3,46E-01	3,9E-01	3,65E-01	4,69E-01			-11%
Acides (mg/g)	6,22E-02	7,91E-02	7,05E-02	9,44E-02			-21%
Ester d'acétate (mg/g)	8,81E-03	7,11E-02	8,74E-03	8,34E-02			-88%

Paramètres étudiés	1L		250 mL		15 mL		Taux de variation (%)
	MS400 +1 mg/L de phytostérol	MS400 +15 mg/L de phytostérol	MS400 +1 mg/L de phytostérol	MS400 +15 mg/L de phytostérol	MS400 +1 mg/L de phytostérol	MS400 +15 mg/L de phytostérol	
Phase de latence	28,9	28,3	27,2	26,3	26,5	25,9	2%
T <sub>1g</sub> /L (h)	24,4	24,1	20,2	19	18,1	19,7	1%
T <sub>10g</sub> /L (h)	34,2	34	32,6	31,7	32,4	31,6	1%
T <sub>20g</sub> /L (h)	40,2	39,7	38,5	37,2	38,6	37,8	1%
T <sub>30g</sub> /L (h)	47	45,8	44,5	42,7	45,2	43,8	3%
T <sub>40g</sub> /L (h)	55,5	53,1	51,6	49,4	52,9	50,9	5%
T <sub>50g</sub> /L (h)	66	62	59,8	57,3	61,7	58,9	6%
T <sub>60g</sub> /L (h)	78,2	71,7	69,5	66,2	72,2	67,9	9%
T <sub>70g</sub> /L (h)	92,4	83,5	81,3	77,1	84,9	78,5	11%
T <sub>80g</sub> /L (h)	110,7	98,6	96,4	90,9	100,6	91,2	12%
T <sub>90g</sub> /L (h)	138,4	143,3	118,9	115,1	123,6	107,3	-3%
V <sub>max</sub> (h)	1,7	1,74	1,78	1,86	1,66	1,7	-2%
T <sub>max</sub> (h)	39	38,7	37,4	36,4	36,5	35,8	1%
CO <sub>2</sub> max (h)	17,2	18,1	18,1	18,6	16,6	16,8	-5%
CO <sub>2</sub> (h)	92,6	90,5	92,6	91,3	95,6	95,5	2%
Glycérol (g/g)	3,07E-02	3,29E-02	3,09E-02	3,4E-02			-7%
Acétate (g/g)	1,21E-03	8,78E-04	1,29E-03	1,34E-03			37%
Succinate (g/g)	7,21E-03	5,31E-03	9,69E-03	5,62E-03			36%
Propanol (mg/g)	9,15E-02	1E-01	9,82E-02	1,02E-01			-9%
Ester d'éthyle (mg/g)	1,57E-02	1,38E-02	1,21E-02	1,02E-02			14%
Alcools supérieurs (mg/g)	1,82E-01	3,9E-01	2,3E-01	4,69E-01			-54%
Acides (mg/g)	1,13E-01	7,91E-02	1,03E-01	9,44E-02			43%
Ester d'acétate (mg/g)	1,06E-01	7,11E-02	1,25E-01	8,34E-02			50%

Tableaux présentant les taux de variation des principaux paramètres de fermentation. Ces taux sont calculés entre des fermentations menées en condition optimale (MS400 + 15 mg/L de phytostérol) et en condition pauvre en azote (MS100) (en A). En B, les taux sont calculés entre la modalité optimale et carencée en stérol (MS400 + 1mg/L de phytostérol). Les taux de variation sont calculés avec la formule suivant : 
$$\left( \frac{\text{Paramètre cinétique modalité carencée} - \text{paramètre cinétique modalité optimale}}{\text{paramètre cinétique modalité optimale}} \right) \times 100.$$

à 95,6% en 250 mL) par rapport à la modalité optimale et cela à toutes les échelles. Ce qui est à l'origine du ralentissement au niveau des cinétiques en **Figure 16**. Au niveau métabolique, une plus forte production d'esters d'acétate est par exemple toujours présente. Elle expliquée par l'impact des lipides sur l'expression d'une des enzymes participant à sa biosynthèse.<sup>3</sup>

L'utilisation d'un moût synthétique à faible teneur en azote reste toujours à l'origine de fermentations languissantes (difficulté à terminer la fermentation alcoolique) de plusieurs semaines, avec une faible activité fermentaire ( $v_{\max}$  de 0,6 contre 1,7 en moyenne dans les autres modalités) et donc un faible nombre de cellules ( $\sim 80.10^6$  cellules/mL pour toutes les échelles contre  $185.10^6$  cellules/mL en modalité optimale, **Figure 12**). Ces fermentations présentent également à toutes les échelles, des phases de latence plus courtes suggérant qu'un excès d'azote (400 mg/L pour les autres modalités) impacte négativement le début de fermentation. Au niveau métabolique, le propanol, marqueur de la disponibilité en azote dans le moût est toujours en plus faible proportion par rapport aux autres modalités (**Figure 15**).<sup>14,19</sup>

Enfin, la modalité sans carence est toujours à l'origine de fermentations optimales : une consommation totale du sucre sur des temps très courts (moins de 150 h, **Figure 16**), une activité fermentaire élevée ( $v_{\max}$  le plus élevé) et donc une concentration cellulaire importante.

La prévalence de l'effet du milieu est confirmée par le calcul du « taux de variation » entre la modalité optimale et la modalité carencée (**Tableau 2**). Pour la grande majorité des paramètres fermentaires évalués, les taux de variation sont du même ordre de grandeur (**Tableau 2**). Ceci démontre la conservation et la prédominance de l'effet milieu (**Tableau 2**) et cela même pour le MCC où l'impact du changement d'échelle est très important (**Figure 14**).



#### IV. Conclusion et perspectives

Les nouvelles problématiques de la filière œnologique doivent être abordées à différentes échelles (screening sur des échelles haut débit, phase validation à l'échelle pilote, ...). L'UMR SPO dispose alors de plusieurs échelles de fermentation, dont le robot de fermentation haut débit PhenOFerm (15 ou 250 mL). Ce stage avait alors pour objectif d'évaluer ce dispositif haut débit et de réaliser en parallèle une étude bibliographique. L'évaluation expérimentale a nécessité de réaliser 160 fermentations en 15 mL, 16 en 250 mL et 24 en 1 L. La comparaison des fermentations démontre une haute répétabilité des réplicats aux trois échelles avec de faibles écarts-types, démontrant alors la fiabilité des résultats obtenus. L'analyse statistique des résultats démontre la prévalence de l'effet milieu sur l'effet échelle. Le classement entre les différents milieux testés est conservé aux différentes échelles, et cela, même en absence de reproductibilité totale. L'ensemble des résultats semble démontrer une oxygénation plus importante en 250 mL. Dans ces volumes, la durée de fermentation est réduite, le  $v_{max}$  est plus important et la physiologie des levures est fortement impactée (modification des ratios des différents métabolites carbonés et arômes fermentaires). Il sera donc nécessaire de redéterminer quel niveau d'oxygénation appliquer à cette échelle et vérifier la bonne saturation en 1 L. L'évaluation révèle également l'importance de la conduite de la fermentation en 15 mL. Pour des milieux pauvres en stérol, il sera nécessaire d'utiliser un clapet anti-retour pour éviter l'entrée d'O<sub>2</sub> (et de compenser la carence). A l'inverse pour des modalités moins stringentes un filtre cellulose (sans oxygénation préalable) pourra être utilisé. Le dénombrement cellulaire démontre l'importance du rapport entre le volume fermentaire et la vitesse d'agitation pour endiguer le cisaillement des amas cellulaires et les discordances observées au niveau du métabolisme à cette échelle. Il faudra alors redéterminer l'agitation à appliquer en 15 mL. Ainsi, les fermentations haut débit diffèrent de l'échelle de 1 L mais elles sont capables de produire des données cohérentes et apportent un avantage logistique considérable. Les différentes échelles doivent donc être utilisées de façon complémentaire et en fonction des demandes (analyses en aval et disponibilité en moût initial). L'échelle de 15 mL pourra servir au pré-screening de souches au niveau des cinétiques fermentaires. L'échelle de 250 mL permettra ensuite de faire un screening plus approfondi au niveau du métabolisme. La recherche de nouvelles souches au fort potentiel œnologique étant en constante augmentation, il serait intéressant par la suite de tester la compatibilité du dispositif PhenOFerm avec des souches non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces* non commercialisées. Il sera impératif de vérifier l'absence de contamination (due à l'environnement des fermenteurs) et la possibilité de suivre des



fermentations où l'activité fermentaire est très faible. Ainsi, selon les données expérimentales et bibliographiques de ce stage, l'existence de plusieurs échelles de fermentation complémentaires a toute son importance pour réaliser une étude complète. Les plus petites échelles permettent de multiplier les modalités à tester et de réaliser des premières évaluations d'itinéraires de vinification, orientant les essais de validation en plus grand volume. L'objectif des petites échelles n'est alors pas de mimer la réalité mais de s'en rapprocher pour donner un aperçu de ce qui pourrait être obtenu en cave (appréhender certains phénomènes). Le choix de l'échelle de fermentation doit se faire comme étant un compromis entre l'utilité et la représentativité des fermentations pour répondre au mieux aux problématiques posées.

## V. Références bibliographiques

1. Bely, M., Sablayrolles, J.-M., and Barre, P. (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **70**: 246–252.
2. Ciani, M., Comitini, F., and Mannazzu, I. (2008) Fermentation. In *Encyclopedia of Ecology*. (ed). Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. pp. 1548–1557.
3. Girardi Piva, G., Casalta, E., Legras, J.-L., Tesnière, C., Sablayrolles, J.-M., Ferreira, D., *et al.* (2022) Characterization and Role of Sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during White Wine Alcoholic Fermentation. *Fermentation* **8**: 90.
4. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., *et al.* (1996) Life with 6000 Genes. *Science* **274**: 546–567.
5. Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., Maris, A.J.A. van, Pronk, J.T., and Dickinson, J.R. (2008) The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2259–2266.
6. Hirst, M.B., and Richter, C.L. (2016) Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* **67**: 361–370.
7. Holst Pellekaan, N. van, Walker, M.E., Watson, T.L., and Jiranek, V. (2021) ‘TeeBot’: A High Throughput Robotic Fermentation and Sampling System. *Fermentation* **7**: 205.
8. Hussenet, C. (2017) Instrumentation, modélisation et automatisation de fermenteurs levuriers à destination œnologique [Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay].
9. Klerk, J. (2010) Succinic acid production by wine yeasts [Thèse de doctorat, Stellenbosch University].
10. Lambrechts, M.G., and Pretorius, I.S. (2019) Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *SAJEV* **21** :97–129
11. Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M. del C., Carrau, F., Beltran, G., and Mas, A. (2016) Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol* **7**.
12. Malina, C., Yu, R., Björkeröth, J., Kerkhoven, E.J., and Nielsen, J. (2021) Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**: e2112836118.
13. Moreno-Arribas, M.V., and Polo, M.C. (2009) Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In *Wine Chemistry and Biochemistry*. (eds). Springer New York, New York, NY. pp. 3–22.
14. Mouret, J.R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., and Sablayrolles, J.M. (2014) Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Research International* **62**: 1–10.
15. Mouret, J.-R., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., and Sablayrolles, J.-M. (2021) Study of Oenological Fermentation : Which Strategy and Which Tools? *Fermentation* **7**: 155.
16. Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Sablayrolles, J.-M., and Farines, V. (2017) Impact of initial lipid content and oxygen supply on alcoholic fermentation in champagne-like musts. *Food Research International* **98**: 87–94.
17. Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., *et al.* (2015) Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 2291–2304.
18. Rollero, S. (2015) Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par

*Saccharomyces cerevisiae* en fermentation œnologique [Thèse de doctorat, Montpellier SupAgro].

19. Seguinot, P. (2019) Vers une meilleure exploitation du potentiel enzymatique et métabolique de *Metschnikowia pulcherrima* et *Torulasporea delbrueckii* pour la production d'arômes en fermentation œnologique [Thèse de doctorat, Montpellier SupAgro].

20. 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.

21. Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., and Henschke, P.A. (2011) Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry* **127**: 1072–1083.

22. Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., and Henschke, P.A. (2012) Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry* **135**: 2863–2871.

23. Walker, G., and Stewart, G. (2016) *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* **2**: 30.



## Liste des annexes

<b>Figure S1.</b> Liste des questions posées au cours des interviews de professionnels.....	6
<b>Figure S2.</b> Vérification de la répétabilité des échelles de 1 L et de 250 mL.....	12
<b>Tableau S1.</b> Composition de base des moûts synthétiques MS400 et MS100 à 200 g/L de sucre.....	6
<b>Tableau S2.</b> Composition de la solution mère d'acides aminés présente dans les moûts synthétiques.....	6
<b>Tableau S3.</b> Composition de la solution mère de vitamines présente dans les moûts synthétiques.....	6
<b>Tableau S4.</b> Composition de la solution mère de facteurs anaérobies présente dans les moûts synthétiques.....	6
<b>Tableau S5.</b> Composition de la solution mère de chlorure de fer présente dans les moûts synthétiques.....	6
<b>Tableau S6.</b> Composition de la solution mère d'oligo-éléments présente dans les moûts synthétiques.....	6

## VII. Annexes

**Tableau S1. Composition de base des moûts synthétiques MS400 et MS100 à 200 g/L de sucre.**

Composé	Quantité par litre
Glucose	100 g
Fructose	100 g
Acide malique	6 g
Acide citrique	6 g
Phosphate de potassium	0,75 g
Sulfate de potassium	0,50 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Chlorure de calcium	0,155 g
Chlorure de sodium	0,20 g
Chlorure d'ammonium	0,108 g (MS100) ou 0,43 g (MS400)
Solution mère d'acides aminés*	3,08 mL (MS100) ou 12,32 mL (MS400)
Solution mère d'oligo-éléments *	1 mL
Solution mère de vitamines*	10 mL
Solution mères de facteurs anaérobies *	15 mg ou 1 mg
Solution mère de chlorure de fer*	1 mL

Le moût synthétique mime la composition d'un moût naturel en vinification blanc. Sa composition peut être contrôlée et modifiée en fonction des objectifs de l'expérimentation. Les différents composés du MS sont présentés dans le tableau en g/L ou mL/L.\* La composition de ces solutions est présentée en annexe (**Tableau S2 à S6**).

**Tableau S2. Composition de la solution mère d'acides aminés présente dans les moûts synthétiques.**

Composés	Concentration (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	20
Tyrosine	1,4
Tryptophane	13,7
Isoleucine	2,5
Acide aspartique	3,4
Acide glutamique	9,2
Arginine	28,6
Leucine	3,7
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
L-Cystéine	1,0
Proline	46,8

La solution d'acides aminés utilisée pour le milieu synthétique est préparée par dilution des acides aminés dans une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 0,203 M.

**Tableau S3. Composition de la solution mère de vitamines présente dans les moûts synthétiques.**

Composés	Quantité par litre
Myo-inositol	2 g
Pantothénate de calcium	0,15 g
Thiamine, hydrochloride	0,025 g
Acide nicotinique	0,2 g
Pyridoxine	0,025 g
Biotine	3 mL

**Tableau S4. Composition de la solution mère de facteurs anaérobies présente dans les moûts synthétiques.**

Composés	Quantité pour 100 mL de solution mère
$\beta$ -sistérol	2 g
Tween 80	50 mL
Ethanol pur	Qsp 100 mL

La solution mère de facteurs anaérobies utilisée pour la préparation des moûts synthétiques contient des lipides sous forme de  $\beta$ -sistérol et de Tween 80. Le Tween 80 contient des acides gras à longues chaînes : de l'acide oléique majoritairement, de l'acide linoléique, de l'acide palmitique et de l'acide stéarique.

**Tableau S5. Composition de la solution mère de chlorure de fer présente dans les moûts synthétiques.**

Composé	Concentration (g/L)
Chlorure de fer (III) hexahydraté	20

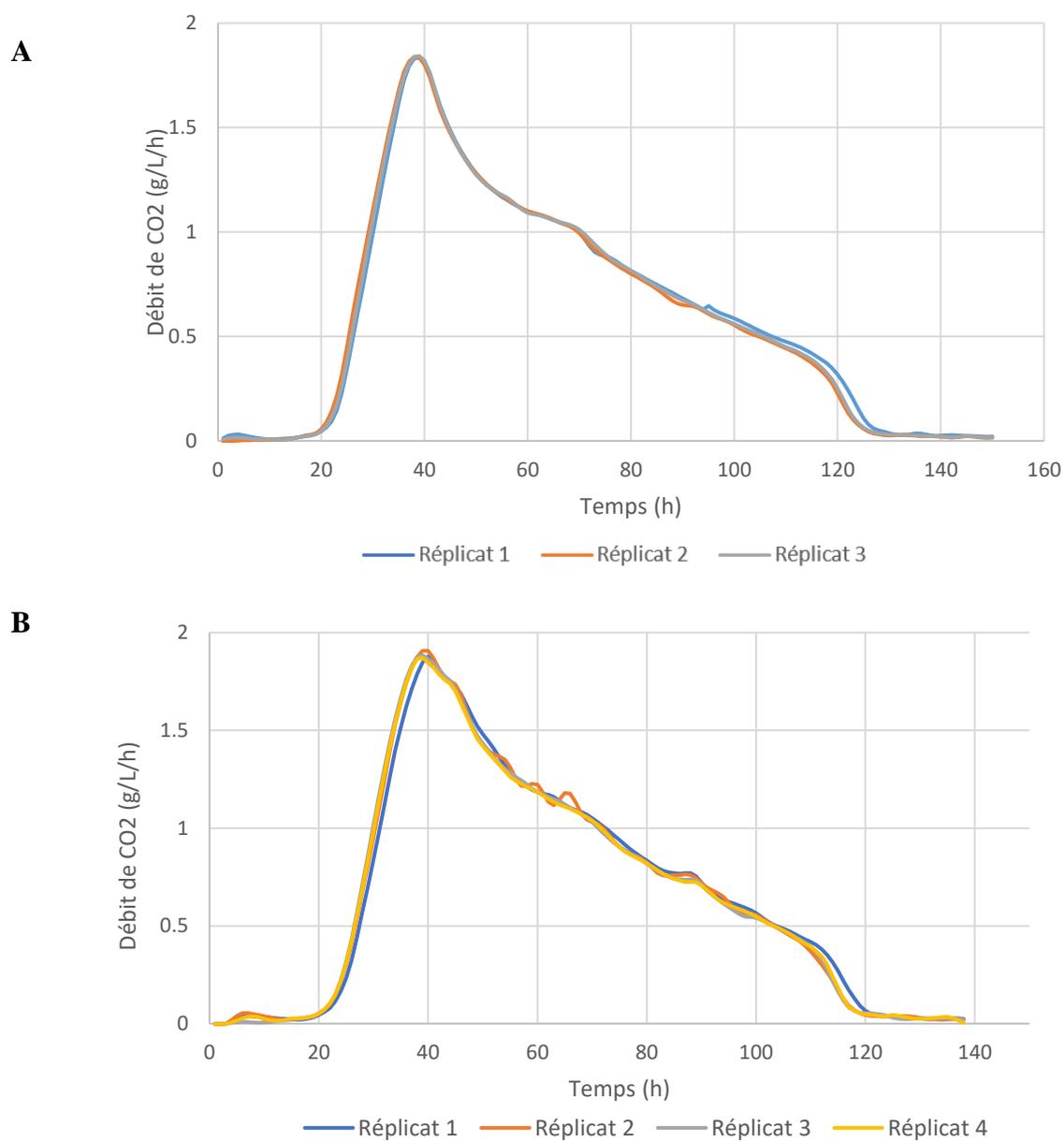
**Tableau S6. Composition de la solution mère d'oligo-éléments présente dans les moûts synthétiques.**

Composés	Concentration (g/L)
Sulfate de manganèse monohydraté	4
Sulfate de zinc heptahydraté	4
Sulfate de cuivre pentahydraté	1
Iodure de potassium	1
Chlorure de cobalt hexahydraté	0,4
Acide borique	1
Ammonium heptamolybdate	1

QUESTIONS	OBSERVATIONS / NOTES
<p>Q1. Quel est l'objectif principal/ contexte de vos travaux ? Quelle est la place de la fermentation alcoolique dans ces travaux (outil ou vrai objet d'étude) ?</p> <p>Q2. Sur quel type de matrice travaillez-vous (blanc, rosé, rouge ou moût synthétique) ?</p> <p><b>Q3. A quelle échelle de fermentation travaillez-vous ? Et avez-vous une échelle de fermentation de référence ?</b></p> <p><b>Q4. Dans le cadre de vos projets, avez-vous besoin de vous rapprocher au plus près des conditions réelles ou l'échelle de fermentation est choisie pour des questions pratiques, économiques, ... ?</b></p> <p><b>Q5. Avez-vous comparé différentes échelles pour choisir votre échelle de travail ?</b></p> <p>Q6. Possédez-vous plusieurs équipements de différentes échelles ? Si oui pour quelle raison ?</p> <p>Q7. Ces équipements sont-ils commerciaux ou « réalisés à façon » (prototype) ?</p> <p><b>Q8. Est-ce qu'un équipement haut débit et robotisé serait utile pour vos travaux ?</b></p> <p>Q9. Faites-vous des suivis en ligne au cours de la fermentation ? Si oui, lesquels et à quelle fréquence ? Si non pensez-vous que le suivi de certains paramètres serait utile ?</p> <p>Q10. En cas d'utilisation d'un suivi en ligne, quels sont les paramètres qui vous permettent de caractériser la fermentation (par exemple, simple suivi d'un paramètre ou calcul de la vitesse associée ?)</p> <p>Q11. Si vous ne faites pas de suivi en ligne, quelles sont les raisons ?</p> <p>Q12. Quelles sont les mesures hors ligne que vous faites avant et après la fermentation ?</p> <p>Q13. Faites-vous des prélèvements pendant la fermentation ? Si oui, que mesurez-vous et à quelle fréquence : en fonction du temps ou de l'avancement de la réaction ?</p> <p>Q14. Faites-vous systématiquement une analyse sensorielle des vins obtenus ? Si oui, combien de personnes sont impliquées et avec quel protocole ?</p>	

**Figure S1. Liste des questions posées au cours des interviews de professionnels.**

La liste de questions a été préétablie par l'équipe avant le début du stage. Les questions modifiées ou ajoutées ensuite sont présentées en rouge. Cette liste a été posée à une dizaine de professionnels du secteur privé et public. Ces personnes travaillent sur des thématiques basées sur la fermentation alcoolique et à des échelles variées (laboratoire à industrielle).



**Figure S2. Vérification de la répétabilité des échelles de 1 L et de 250 mL.**

La répétabilité des différents réplicats a été vérifiée par comparaison des cinétiques fermentaires. Les fermentations sont menées avec un MS400 + 15 mg/L de phytostérol, avec la souche SC1 et à 22°C. En A, sont présentés les 3 réplicats obtenus à l'échelle de 1 L et en B les 4 réplicats obtenus à l'échelle de 250 mL.

## Résumé

L'émergence de nouvelles variétés de raisin et l'évolution des goûts des consommateurs requièrent de comparer de nombreuses souches et modalités fermentaires et donc la mise en place de plans expérimentaux comportant un nombre élevé d'expériences. Pour répondre à cet enjeu, l'UMR SPO a mis en place une plateforme robotisée pouvant réaliser 360 fermentations en 15 mL ou 96 en 250 mL. L'objectif du stage est de comparer ces deux échelles avec une échelle de référence (1 L) et de réaliser en parallèle une étude bibliographique (interviews de professionnels et bibliographie). L'analyse statistique des résultats démontre la prévalence de l'effet modalité (milieu de culture) sur l'effet échelle : même si une reproductibilité totale n'est pas observée entre les différentes échelles, le classement entre les modalités reste identique à chaque échelle (à l'exception des métabolites du MCC en 15 mL). L'oxygénation reste le principal obstacle, pour la mise en œuvre des levures à l'échelle de 250 mL. En effet, une modification de la cinétique fermentaire et de l'état physiologique est notée. Les résultats obtenus à l'échelle de 15 mL révèlent l'importance de la conduite de la fermentation. Le système de fermeture est à adapter en fonction du milieu de fermentation et le rapport entre le volume fermentaire et la vitesse d'agitation doit être respecté pour endiguer les forces de cisaillement. En accord avec l'étude bibliographique, la miniaturisation de la vinification entraîne une perte de contact avec la réalité mais reste un outil complémentaire aux autres échelles (screening haut débit, ...). Par la suite il serait intéressant de tester le potentiel du robot de fermentation pour le screening de souches non-*Saccharomyces*, au fort potentiel œnologique.