

GRAND PRIX 2009

Katharina Zott

LES LEVURES  
NON-SACCHAROMYCES :  
dynamique, caractérisation  
et interaction avec *Saccharomyces*  
durant les étapes pré-fermentaires  
et la fermentation alcoolique



## PRÉFACE

Le Groupe Amorim, né du liège en 1870 au Portugal, a fondé les bases de son développement sur cette extraordinaire matière première, à travers la production de cet humble mais inséparable compagnon du Vin : le bouchon de liège.

Notre volonté de servir la cause du vin s'est toujours exprimée dans la recherche technologique sur la filière liège, base de notre activité.

En 1992, nous avons souhaité aller plus loin et nous engager davantage aux cotés des chercheurs en œnologie en créant l'Académie Amorim, un lieu de rencontre d'échange entre œnologues, ingénieurs, professeurs, sommeliers, auteurs, artistes... tous animés d'une même passion du Vin.

Chaque année, notre Académie encourage et soutient la recherche en œnologie par la remise d'un Prix à un chercheur ou à une équipe de chercheurs ayant fait paraître des travaux significatifs qui concourent à la défense et à la promotion de la qualité du Vin. Que soient ici saluées les personnalités, membres de cette Académie, qui contribuent si généreusement à cette mission. Je formule le vœux que cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix de l'Académie, devienne, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin.

**Americo Ferreira de AMORIM**

Président du Groupe Amorim

# GRANDS PRIX DE L'ACADÉMIE AMORIM

Grand Prix 2008 - Elise SARRAZIN

*« Recherches sur l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble issus des cépages Sémillon et Sauvignon blanc. Caractérisation de composés clés et étude de leur genèse »*

Grand Prix 2007 - Alexandre PONS

*« Recherche sur l'arôme de vieillissement prématuré des vins blancs sec »*

Grand Prix 2006 - Paulo LOPES

*« Etude des phénomènes oxydatifs pendant le vieillissement des vins en bouteille. Rôle de l'obturateur »*

Grand Prix 2005 - Stéphane LA GUERCHE

*« Les défauts moisis terreux des vins : la géosmine identifiée comme principale responsable »*

Grand Prix 2004 - Michael JOURDES

*« Réactivité, sythèse, couleur et activité biologique d'Ellagitannins C-Glycosidique et Flavano-Ellagi tannins »*

Grand Prix 2003 Dominique ROUJOU DE BOUBEE

*« Recherches sur la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine dans les raisins et dans les vins »*

Grand Prix 2002 - Catherine PEYROT DES GACHONS

*« Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L.cv Sauvignon »*

Grand Prix 2001 - René SIRET

*« Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (Vitis vinifera L.) à l'aide de marqueurs microsatellites : application à la caractérisation des cépages dans les vins »*

Grand Prix 2000 - Takatoshi TOMINAGA

*« Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin »*

Grand Prix 1999 - Isabelle CUTZACH-BILLARD

*« Etude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement. Son origine. Sa formation »*

Grand Prix 1998 - Virginie MOINE-LEDOUX

*« Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins »*

Grand Prix 1997 - Valérie LAVIGNE-CRUEGE

*« Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et l'élevage des vins blancs secs »*

Grand Prix 1996 - Sylvie BIAU

*« Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux »*

Grand Prix 1995 - Samuel LUBBERS

*« Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme »*

Grand Prix 1994 - Ziya GÜNATA

*« Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique »*

Grand Prix 1993 - Pierre-Louis TEISSEDRE

*« Le plomb, du raisin au vin »*

Grand Prix 1992 - Pascal CHATONNET

*« Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques »*

Ce sujet confirme l'importance de l'écosystème lévurien pendant les premières étapes de la vinification et met en évidence la complexité de celui-ci.

Katharina Zott a choisi ici un thème innovant et d'actualité. Contrairement à la pensée établie, la candidate montre la présence de levures non-*Saccharomyces* tout au long de la macération pré-fermentaire et de la fermentation alcoolique.

Il ressort de ces travaux novateurs que les levures non-*Saccharomyces* ne sont pas aussi indésirables que nous le pensions. Au contraire, elles participent à l'élaboration complexe des arômes des vins, notamment des vins blancs. En effet, Katharina Zott démontre pour la première fois, que les levures non-*Saccharomyces* peuvent être à l'origine d'arômes de type buis et surtout pamplemousse.

Ces travaux mériteraient d'être poursuivis tant les premiers résultats ouvrent de grandes perspectives de recherches dont l'intérêt, pour le monde du vin, est certain : le contrôle de la diversité lévurienne lors des premières étapes de la vinification, comme exposé par Katharina Zott, peut contribuer à augmenter la complexité aromatique, et ainsi améliorer la qualité de nos Vins.

Pour la dix-septième édition de son concours, l'Académie AMORIM a souhaité récompenser des travaux dont le caractère novateur est évident. Merci à tous ses membres pour ce travail effectué avec tant de conscience chaque année !

**Robert TINLOT**  
Président de l'Académie Amorim

GRAND PRIX 2009 DE L'ACADÉMIE AMORIM

Katharina Zott

LES LEVURES  
NON-SACCHAROMYCES :  
dynamique, caractérisation  
et interaction avec *Saccharomyces*  
durant les étapes pré-fermentaires  
et la fermentation alcoolique

THÈSE DE DOCTORAT, Faculté d'œnologie, Université de Bordeaux,  
ISVV de Bordeaux, Aquitaine, INRA UMR 1219

## INTRODUCTION

---

La diversité organoleptique des vins trouve son origine dans plusieurs facteurs : cépage, terroir, mode d'élevage... La complexité de la microflore du moût, issue pour partie de l'écosystème présent à la surface des baies et pour partie des pratiques œnologiques, dont la macération pré-fermentaire à froid (MPF), contribuent à cette variabilité.

Pour pouvoir évaluer avec pertinence l'impact des levures sur le vin, qu'il soit positif ou négatif, il est crucial de pouvoir d'abord connaître leur écosystème, c'est à dire leur dynamique et leur nature. De nombreuses questions se posent alors, et il est essentiel de pouvoir y répondre : quelle est la part d'implication des levures dans les premières étapes de la vinification puis en fin de fermentation alcoolique ? Cet écosystème est-il stable d'un millésime à l'autre au sein d'une même cave ? Quel est l'impact des itinéraires œnologiques et des techniques associées sur le développement des levures ?

Dans cette optique, nous avons suivi des moûts en MPF et fermentation alcoolique (FA) pendant 3 millésimes en étudiant d'une part la dynamique des levures globales, c'est-à-dire provenant des deux groupes non-*Saccharomyces* (NS) et *Saccharomyces*, et d'autre part, en utilisant un milieu sélectif, la dynamique propre aux levures non-*Saccharomyces*. L'impact de facteurs différents (température, oxygène et moment de l'inoculation des moûts avec des LSA) sur le développement et la diversité des levures NS durant la MPF a été abordé et clarifié.

Nous nous sommes ensuite attachés à étudier le fonctionnement global de l'écosystème levurien au travers de l'analyse des interactions existantes entre les levures et les paramètres les caractérisant.

Les limites rencontrées dans la caractérisation des levures avec les méthodes existantes nous ont alors conduit à développer la méthode de la PCR en temps réel pour le suivi (identification et quantification) de plusieurs espèces NS.

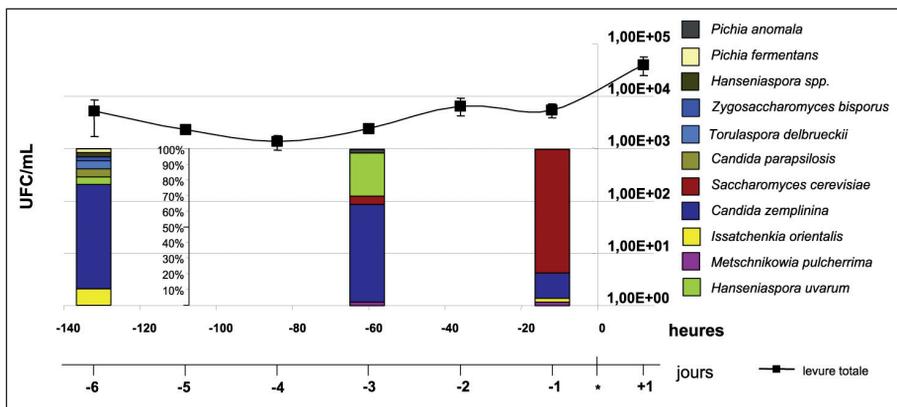
Enfin, dans une dernière partie, nous avons évalué certaines propriétés œnologiques des levures NS, à savoir leur résistance au stress et leur impact organoleptique sur l'arôme des vins.

## I. Dynamique et diversité levurienne pendant les premières étapes de la vinification

D'une manière générale, nous observons que les populations levuriennes (LT et NS) sont relativement stables pendant cette étape pré-fermentaire. L'espèce *Saccharomyces*, minoritaire en début de MPF, colonise de façon importante le milieu au fur et à mesure de l'avancement du procédé. Ce phénomène s'accroît avec l'avancée des vendanges, le remplissage des cuves et la colonisation du chai par la microflore fermentaire. En pratique, la difficulté de maîtriser le démarrage de la FA en fin de campagne de vendange est souvent observée par les vinificateurs. La microflore levurienne totale est néanmoins majoritairement dominée par une population de levures NS. Cette population est stable pendant la MPF mais une légère croissance en fin de macération est à noter, qui la mène à son niveau maximal dans la première moitié de la FA. Enfin, elle est présente à des niveaux de l'ordre de  $10^3$  à  $5 \times 10^4$  UFC/mL en fin de FA. La population NS se caractérise par une grande diversité d'espèces NS, en général maximale en début de MPF pour diminuer en fin de traitement (figure 1). Le degré de diversité observé au sein de la population des NS est relativement constant d'un château et d'un millésime à l'autre ; environ 10 espèces différentes sont ainsi répertoriées mais la fréquence d'apparition de chacune est fluctuante.

**Figure 1**

*Dynamique et diversité des levures (LT) pendant la MPF pour le moût X (château II, Merlot, millésime 2006) ; chaque colonne représente 100% de la population levurienne isolée.*



0h = levurage, - heures/jours = temps de la MPF, + heures/jours = temps de la FA ;  
\* moment du levurage ; les valeurs représentent la moyenne de 4 dénombrements minimum par échantillon.

En 2005, les espèces *Hanseniaspora uvarum* et *Lodderomyces elongisporus* sont retrouvées majoritaires en MPF. *Lodderomyces elongisporus* avait déjà été isolée dans des vins à l'embouteillage [1] mais c'est la première fois qu'elle est trouvée dans des moûts non fermentés. En 2006 et en 2007, *Hanseniaspora uvarum* et *Candida zemplinina* sont les espèces les plus abondantes. Cette dernière espèce, isolée à partir de grappes et moûts botrytisés, est identifiée comme génétiquement proche mais différente de *Candida stellata* [2]. Hierro et collaborateurs (2006b) ont étudié les levures NS présentes à 4°C durant la MPF. En 2002 ils ont isolé *Hanseniaspora uvarum* et *Candida stellata*, espèces majoritaires dans un moût de cépage Tempranillo en MPF. Nous avons, pour notre part, observé qu'une température basse de 4°C favorise la présence de *Candida zemplinina*. Ce résultat est concordant avec le caractère osmo- et psychrotolerant décrit pour cette espèce [2].

*Hanseniaspora guilliermondii*, *Cryptococcus albidus*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia fermentans*, *Hanseniaspora spp.*, *Pichia membranifaciens*, *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Zygoascus hellenicus*, *Candida spp.*, et *Debaryomyces hansenii*, isolées en 2006, sont des espèces minoritaires isolées dans notre étude. La littérature rapporte que ces espèces sont souvent reliées aux écosystèmes viti-vinicoles. *Torulasporea delbrueckii* présente un intérêt certain pour les fermentations mixtes avec *Saccharomyces*

*cerevisiae*, grâce à, par exemple, sa capacité à réduire l'acidité volatile des vins liquoreux [3]. Isolée dans plusieurs échantillons, cette espèce est toujours minoritaire.

Dans certains prélèvements, nous avons constaté la présence d'espèces minoritaires, jusqu'à présent peu ou pas décrites au sein de l'écosystème raisin-vin. C'est le cas d'*Arthroascus schoenii* (Synonyme : *Saccharomycopsis schoenii*, *Pichia nonfermentans*) isolée dans plusieurs échantillons. Deux espèces du genre *Candida*, *Candida pararugosa* et *Candida parapsilosis* ont été également isolées. La deuxième, souvent reliée avec les lésions de la peau [4] a été récemment décrite dans l'écosystème viti-vinicole [5]. Dans des travaux antérieurs, *Candida pararugosa* a été trouvée dans les fèces humaines mais jamais dans le domaine œnologique, ce qui apporte un éclairage nouveau sur l'origine des levures présentes dans les stades précoces d'obtention des moûts de raisin. Le facteur humain comme la récolte manuelle ou la manipulation des grappes pourrait être une source additionnelle de levures NS comme cela a déjà été démontré pour le vignoble et la cave.

Dans nos travaux, et ce pendant 3 millésimes, nous n'avons pas isolé *Brettanomyces bruxellensis*, importante levure d'altération des vins. L'analyse spécifique par PCR DB1, DB2, DB3 et DB4 et PCR en temps réel (PCR quantitative) n'a également pas permis de la mettre en évidence. Cette absence de détection ne contredit pas son éventuelle présence minoritaire dans les moûts, car nous n'avons pas mis en œuvre de milieux d'enrichissement. Cependant, en accord avec nos résultats, différents travaux ne décrivent pas la présence de cette levures d'altération dans les moûts et durant la FA [5-13]. L'absence de *Brettanomyces* dans nos isollements a été confirmée par la méthode de la PCR en temps réel, méthode « culture indépendante » au seuil de détection particulièrement bas.

Les modalités de mise en œuvre des traitements pré-fermentaires à froid dans la pratique (durée, température du moût, remontages, ...) ne sont pas définies précisément. Dans notre travail, nous avons étudié l'incidence de deux facteurs, température et oxygène, dont le rôle sur la croissance des micro-organismes est avéré. L'incidence de la température sur la dynamique des levures a été évaluée au laboratoire. Nous montrons qu'une température de 10°C est nécessaire et suffisante pour contrôler la croissance des levures pendant toute la durée de la MPF et qu'il n'est pas utile de travailler à température plus basse. La température appliquée lors de la MPF influence la diversité et la nature des levures NS. Ainsi, des températures basses favorisent le développement de l'espèce *Candida zemplinina* alors que des températures plus élevées sont favorables à *Hanseniaspora uvarum*.

Ce résultat pourrait expliquer la succession de ces deux espèces observées lors de la MPF et de la FA. En début de MPF, *Candida zemplinina* est majoritaire lorsque la température du moût est basse (entre 10°C et 13°C). En fin de MPF et début de FA, *Hanseniaspora uvarum* devient majoritaire (température plus élevée du fait du réchauffement des cuves). Pendant la FA, *Candida zemplinina* est à nouveau majoritaire. Dans ce cas, des phénomènes d'adaptation à la température et une plus grande résistance au stress œnologique (Sipiczki, 2003) par rapport à *Hanseniaspora uvarum* pourraient expliquer cette succession. Concernant le facteur oxygène, nous pouvons constater que l'apport d'oxygène lors de la MPF ne modifie pas la dynamique ni la diversité des levures mais influence leur survie en fin de fermentation alcoolique.

## II. Fonctionnement de l'écosystème levures – première approche

Dans les moûts de raisin, la microflore est très diversifiée et sa dynamique est en évolution constante. Les observations réalisées ont permis d'identifier, d'isoler et de mettre en collection des souches non-*Saccharomyces* présentes dans les moûts en MPF et FA. Les facteurs expliquant leur présence ou absence restent à déterminer. Pour aborder l'étude du fonctionnement de l'écosystème levure nous avons étudié les phénomènes d'interactions entre non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*.

Dans cette optique, nous avons testé plusieurs souches non-*Saccharomyces* en mélange binaire avec *S. cerevisiae* dans un milieu modèle proche de la composition du moût de raisin au laboratoire. Ces cultures mixtes ont été comparées avec des cultures pures et des cultures

en système de supports perméables Transwell®. Dans ce dernier cas, les levures se multiplient dans des milieux de compositions très proches mais une barrière perméable aux molécules sépare les cellules. Nos dosages de glucose/fructose et éthanol dans les deux compartiments montrent clairement que, malgré un faible décalage, la membrane est perméable à des molécules nutriments et métaboliques pendant la fermentation alcoolique.

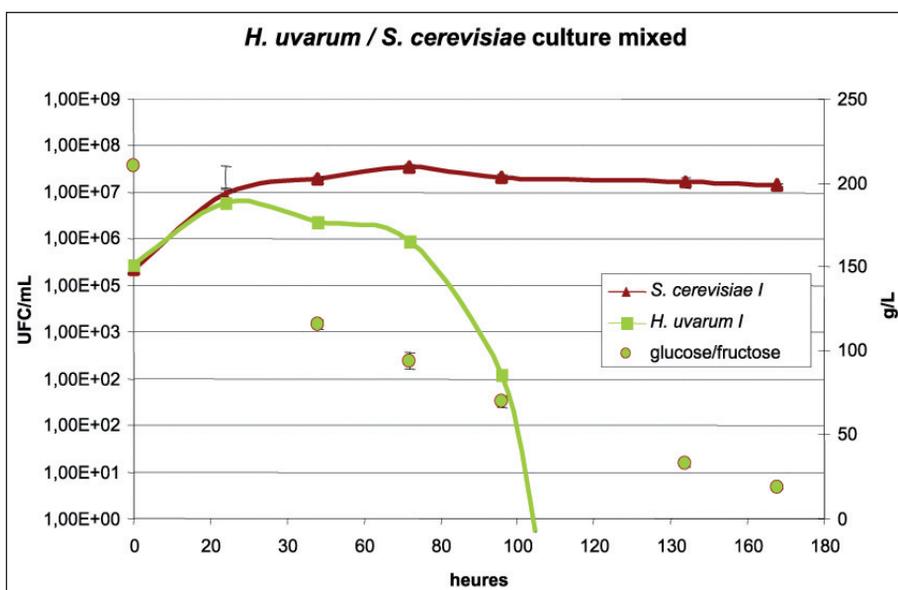
Nous n'avons pas constaté la même interaction entre toutes les non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* dans nos conditions. Pour des taux d'inoculation identiques entre non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*, plusieurs espèces non-*Saccharomyces* n'ont pas réagi, en terme de croissance, à la présence de la levure fermentaire (*K. thermotolerans*; *T. delbrueckii*, *H. spp.* et *M. pulcherrima*). Il est intéressant de noter que les souches NS en fermentation mixte sont capables de se maintenir à des niveaux de population élevés ( $10^7$ - $10^8$  UFC/mL) en fin de FA, pour des teneurs en éthanol de l'ordre de 12 à 13 % vol.

D'autres espèces ont montré une légère limitation dans leur croissance comme *C. zemplinina* ou *Z. hellenicus*. La croissance de ces espèces NS en cultures Transwell® est très proche de celle observée en culture mixte. Un changement du milieu peut être à l'origine de ce faible changement de croissance (disparition d'éléments nutritifs, libération d'éthanol dans le milieu, facteurs toxiques type Killer...).

Pour d'autres espèces comme *B. bruxellensis*, la croissance est significativement limitée en présence de *S. cerevisiae*. La courbe de croissance et les niveaux de populations en culture pure et en culture Transwell® ne diffèrent pas, mais en culture mixte, la population de *Brettanomyces* chute d'un facteur 100 tout au long de la FA. Ce phénomène n'est pas relié à des changements de milieu (facteurs toxiques ou nutritifs) mais plutôt à la présence de populations importantes de *S. cerevisiae*. Après 6 jours de fermentation, la croissance de la population de *Brettanomyces* est toujours limitée par la présence de *S. cerevisiae*. L'hypothèse d'une compétition vis-à-vis de l'espace à coloniser entre *Brettanomyces* et *S. cerevisiae* peut être avancée.

**Figure 2**

*Interaction entre H. uvarum et S. cerevisiae. Suivi de la croissance et de la dégradation des sucres (glucose et fructose) au cours du temps*



D'un autre côté, nos travaux montrent une interaction importante entre *H. uvarum* et *S. cerevisiae* en culture mixte. Un phénomène de mort précoce est mis en évidence pour *H. uvarum*, qui se traduit par une chute sévère de sa population et par l'absence de cellules cultivables après 96 heures (figure 2). Ce phénomène est d'autant plus marqué que le taux d'inoculation de *S. cerevisiae* est élevé. Arneborg et collaborateurs (2005) ont démontré que des phénomènes de confinement, c'est à dire l'action de cellules de *S. cerevisiae* entourant et cloisonnant celles de *H. uvarum*, peuvent augmenter le temps de génération de cette dernière de 15 %. Cependant, si ces résultats montrent l'incidence

d'un contact physique d'une espèce sur une autre, ils ne peuvent pas expliquer la mort précoce des levures *H. uvarum* en culture mixte.

La mort précoce de l'espèce *H. uvarum* a été décrite par plusieurs auteurs, sans démonstration claire de la cause de cette observation [14, 15]. Nous décrivons ce phénomène pour deux souches de *H. uvarum* et de *S. cerevisiae*. Il se pourrait donc que cette interaction entre *H. uvarum* et *S. cerevisiae* soit générale au sein de cette espèce NS, mais nous ne pouvons pas exclure que certaines souches soient peu sensibles à la présence de *S. cerevisiae*. Dans nos observations de la dynamique levurienne, nous constatons qu'à la fin de la FA, *H. uvarum* n'est plus dominante au sein des NS et que très souvent, cette espèce n'est plus isolée à ce stade. Néanmoins, en 2006, nos observations rapportent la présence importante de cette espèce au sein de la population NS dans un prélèvement en fin de FA. Il serait intéressant de tester le comportement en culture mixte des souches *H. uvarum* isolées dans ce prélèvement. Enfin, ce phénomène de mort précoce de *H. uvarum* n'est pas provoqué par une autre espèce telle que *C. zemplinina*, par ailleurs abondante au sein de l'écosystème NS pendant la FA.

Lors du suivi de la population de *H. uvarum* en culture pure séparée de *S. cerevisiae* par le système de supports perméables Transwell®, nous avons constaté la survie de la population de *H. uvarum*. Le système Transwell® nous a donc permis de démontrer que cette interaction est indépendante des facteurs du milieu, nutritifs ou toxiques. L'étude de la population de *H. uvarum* en culture mixte avec *S. cerevisiae* et séparée d'une culture pure *H. uvarum* par le système Transwell®, a permis de préciser ce phénomène. Alors que la mort précoce est apparue pour *H. uvarum* en culture mixte après 144 heures, la culture pure de *H. uvarum* n'a pas été affectée. L'implication d'une molécule toxique dont la synthèse serait déclenchée par un contact physique entre les deux espèces peut donc être exclue. Ainsi, nous montrons clairement qu'un contact physique entre les deux populations est nécessaire pour constater cette mort précoce. Cette interaction de type « cell-cell contact », provoquée par le développement d'une espèce qui restreint la croissance d'une deuxième sans que cela affecte la première, est désignée par le terme d'amensalisme. Dans l'écosystème vin, ce type d'interaction a déjà été rapporté entre levures et bactéries par plusieurs auteurs [16].

### **III. Développement de la PCR en temps réel pour l'étude de l'écosystème levure**

Jusqu'à présent, il était admis que les levures non-*Saccharomyces* étaient uniquement présentes au début de la fermentation alcoolique puis étaient supplantées par la levure fermentaire *S. cerevisiae* [17]. Par une approche classique de mise en culture et d'isolement, nous avons montré que les levures NS sont présentes tout au long de la fermentation alcoolique, parfois à des niveaux de population non négligeables ( $10^6$  UFC/mL). Les espèces minoritaires n'ont pas été identifiées mais leur présence pendant toute la durée de la fermentation peut être envisagée.

Pour analyser les levures NS de manière plus juste et faciliter leur suivi, nous avons développé une méthode rapide pour détecter et quantifier différentes de leurs espèces à partir d'échantillons de moûts et de vin : *Candida zemplinina*, *Torulaspota delbrueckii*, *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora spp.* et *Saccharomyces spp.* Utilisée avec succès pour l'identification des levures par PCR-RFLP couplée au séquençage, la région ITS a été mise à profit pour développer une approche par PCR en temps réel. Des couples d'amorces hautement performants et spécifiques ont été conçus à partir de cette région du génome variable entre genres et espèces de levures et bien renseignée pour une large collection de levures non-*Saccharomyces*, dans des bases des données bioinformatiques. Pour tous les couples d'amorces, nous avons testé la spécificité vis-à-vis d'un large échantillonnage d'espèces (entre 61 et 67). Des courbes d'étalonnage ont été établies afin de pouvoir quantifier les populations présentes dans des extraits d'ADN de biomasse totale issue de moûts et de vins.

Le couple d'amorce *Hanseniaspora spp.* permet d'amplifier deux espèces « *uvarum* » et « *guilliermondii* ». Les amplifications ont été négatives pour les autres espèces du genre *Hanseniaspora* testées.

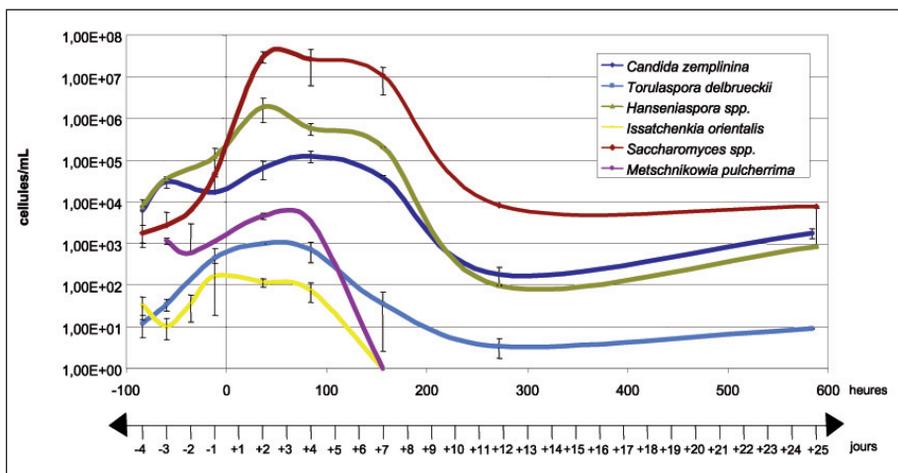
Méthode d'investigation de l'écosystème « culture-indépendante », la PCR en temps réel permet d'éviter un temps d'attente pour la croissance en culture mais également de descendre à des seuils de détection très bas. Nous avons été capables de détecter 1 cellule/mL de *Hanseniaspora* spp. ; 10 cellules/mL pour *Saccharomyces* spp. *Torulaspora delbrueckii* et *Issatchenkia orientalis* ; 10<sup>2</sup> cellules/mL pour *Metschnikowia pulcherrima* et *Candida zemplinina*.

Nous avons évalué la performance de nos amorces sur des ADN extraits provenant de différentes origines (biomasse totale issue de boîtes de pétri sans dilution, de moût ou de vin). La détection des levures par PCR en temps réel a été comparée avec la diversité des espèces établies par isollements sur les mêmes échantillons. Les espèces détectées par isolement sur milieu de culture ont sans exception été également retrouvées par PCR en temps réel.

Nous avons de plus quantifié les espèces cibles dans des moûts frais. Les niveaux de populations obtenus par PCR en temps réel, comparés à ceux obtenus par isolement sur milieux sont cohérents ainsi que la distribution des espèces établie par des méthodes « culture dépendante ». De plus, dans tous ces échantillons, les levures habituellement minoritaires comme *T. delbrueckii* ou *M. pulcherrima* ont été recherchées et quantifiées. Nous avons ainsi démontré leur présence, certes minoritaire, par PCR en temps réel alors qu'elles n'avaient pas été détectées par isolement. Comparés aux méthodes culture dépendante ou par ailleurs, à la PCR-DGGE, ces résultats confirment tout l'intérêt de la méthode de la PCR en temps réel pour la détection et la quantification d'espèces minoritaires dans un écosystème donné, sans limitation et biais liés à la présence d'espèce majoritaire (cas de *Saccharomyces*) [18]. La mise au point des amorces hautement spécifiques et de leurs conditions d'utilisation a permis une évaluation précise et simple des espèces présentes, ainsi que le suivi de leur dynamique (figure 3). Cependant, cette méthode est pour l'instant limitée à la détection de 7 espèces cibles, la détection des autres espèces de l'écosystème doit donc être développée par la suite. Dans le contexte de nos travaux d'interaction entre levures *Saccharomyces* et l'espèce non-*Saccharomyces* *H. uvarum*, il serait très intéressant d'appliquer la PCR en temps réel pour le suivi des populations dans des cultures mixtes.

**Figure 3**

*Dynamique des populations levuriennes établie par PCR en temps réel, de la macération préfermentaire à froid jusqu'à la mise en barrique avant FML.*



0h = inoculation de la levure commerciale, - heures/jours = temps de la MPF, + heures/jours = temps de la FA

Dans nos travaux, nous avons observé la prédominance de *H. uvarum* et sa diminution au sein de la population NS pendant la FA, mais nous l'avons quantifié à 40% dans le moût B en fin de FA avec notre milieu NS sélectif. Hierro et collaborateur ont rapporté que les levures *H. uvarum* dominantes dans le moût ne sont plus détectables en fin de fermentation par culture et isolement sur des milieux lysines. Avec une recherche par

PCR en temps réel, ils ont quantifié cette levure à  $10^4$  cellules/mL en fin de fermentation alcoolique, ce qui est similaire à nos résultats. Le suivi de la population pendant 25 jours a permis de montrer la présence de plusieurs non-*Saccharomyces*, à des niveaux de population de  $10^3$  cellules/mL pour *H. uvarum*, *C. zemplinina* et  $10^1$  cellules/mL pour *T. delbrueckii*. La population *S. cerevisiae* a été évaluée à ce stade à  $10^4$  cellules/mL.

Plusieurs études ont montré une diminution des population *H. uvarum* pendant la fermentation alcoolique, à tel point que les levures *H. uvarum* sont supposées de subir une mort précoce imposée par l'action de *S. cerevisiae*, soit par des molécules toxiques ou par des interactions de type « cell-cell contact ».

Il existe donc une différence entre les valeurs estimées de population de *H. uvarum* par dénombrement sur milieu et celles trouvées par PCR en temps réel. Une réflexion sur la viabilité et la « cultivabilité » des cellules de *H. uvarum* s'impose donc. Sont-elles présentes avec un métabolisme actif tout en n'étant plus cultivables comme cela a déjà été démontré pour les levures de refermentation [19] ?

#### IV. Impact organoleptique des levures non-*Saccharomyces*

L'intérêt œnologique des levures non-*Saccharomyces* est depuis quelques années au cœur de nombreux travaux et discussions au sein de la communauté scientifique. Si leur impact a souvent été jugé comme négatif, certains auteurs décrivent néanmoins les aptitudes technologiques de ce groupe de levures. Leur capacité d'augmenter la complexité du produit final, d'agir comme « productrices » d'arômes fermentaires, d'excréter des activités enzymatiques d'intérêt, sont autant de potentialités qui ont été rapportées dans de nombreuses publications scientifiques.

Nos résultats montrent que les 14 isolats non-*Saccharomyces* testés produisent des arômes fermentaires à des teneurs variables.

La synthèse importante d'acétate de phényl-éthyl par *Hanseniaspora* a été mentionnée par Viana [20]. Dans nos conditions, la plupart des levures non-*Saccharomyces* ont produit des teneurs faibles de ce composé à l'exception de *H. uvarum* (Lm4LT10) qui en produit une quantité supérieure (0,55 mg/L) par rapport à *S. cerevisiae* (0,30 mg/L). Les espèces *I. orientalis* (Lm2LT34) et *K. thermotolerans* (Lm5LT1) libèrent des teneurs élevées d'acétate d'isoamyle. Concernant le phényl-2-éthanol, 4 souches *M. pulcherrima* produisent des teneurs importantes et *I. orientalis* (Lm2LT34) et *T. delbrueckii* (Lm2LT7) produisent des quantités non négligeables. Les composés volatils sont donc générés dans des proportions variables selon l'espèce. Une microflore diversifiée peut ainsi contribuer à la complexité aromatique des vins.

Pineau a démontré en 2007 que les moûts macérés ont des teneurs plus élevées en butanoate d'éthyle, en hexanoate d'éthyle, en propanoate d'isobutyle et en 2-phényléthanol que les moûts non macérés [21]. La macération pré-fermentaire provoque aussi un enrichissement des vins rouges en 6-hydroxyhexanoate d'éthyle, lévulinate d'éthyle et 2-méthylbutanoate d'éthyle [21]. L'évaluation de la capacité des levures non-*Saccharomyces* isolées pendant la MPF à générer ces esters est certainement un objectif futur de recherche.

Des recherches menées par la Faculté d'œnologie ont prouvé que plusieurs molécules porteuses d'une fonction thiol sont impliquées dans l'arôme variétal caractéristique de certains cépages. Les molécules 3SH et 4MSP ont été respectivement identifiées comme responsables de ces arômes pamplemousse et buis. Elles sont présentes dans la baie de raisin sous une forme précurseur inodore, de type S-conjugué à la cystéine et libérées par l'action fermentaire des levures, de façon variable selon les souches de *S. cerevisiae*. Ceci a été démontré pour le 4MSP par Murat en 2001 [22] et pour le 3SH en milieu synthétique, moût Sauvignon blanc et moûts de vin rosé des cépages Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc et Merlot [23, 24]. De plus, *S. bayanus var. uvarum* et ses hybrides avec *S. cerevisiae* ont montré une grande capacité à libérer les thiols volatils de leur forme précurseur [22, 25, 26]. Ceci démontre donc que le choix de la levure fermentaire est décisif pour la vinification des vins de Sauvignon blanc. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait évoqué l'aptitude des levures non-*Saccharomyces* à transformer la forme précurseur en arômes. On peut toutefois noter que depuis plusieurs années, de nombreux travaux témoignent

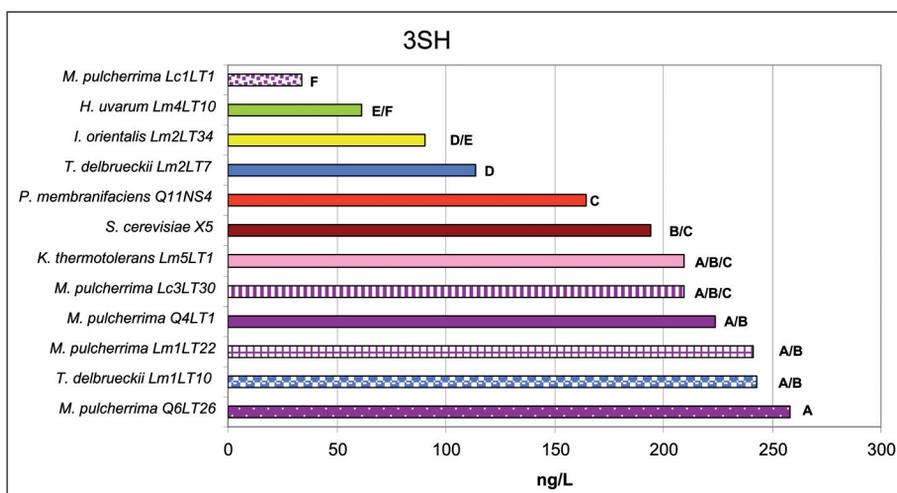
de la contribution positive des levures non-*Saccharomyces* sur la structure aromatique des vins.

Nos résultats montrent que certaines espèces présentent une aptitude à biotransformer; au cours de la fermentation alcoolique, les thiols volatils à partir de leur forme précurseur. Il semble que cette aptitude, à l'image des résultats obtenus pour *S. cerevisiae* ou *S. uvarum* soit variable selon la souche de levure au sein d'une même espèce.

Lors de fermentations partielles (production d'alcool entre 2,5% et 5%), la plupart des levures non-*Saccharomyces* sont capables de libérer le 4MSP mais sans toutefois atteindre le niveau de la levure fermentaire de référence *S. cerevisiae* X5 [24]. *T. delbrueckii* libère des teneurs non négligeables en 3SH et 4 souches de l'espèce *M. pulcherrima* présentent une capacité équivalente ou supérieure à celle de *S. cerevisiae* à libérer le 3SH (figure 4). Des souches *M. pulcherrima* ont également montré leur capacité à générer des esters, ce qui peut, à des concentrations élevées, masquer l'arôme variétal mais, dans une gamme moyenne, augmenter la complexité des vins. *M. pulcherrima* est souvent décrite dans l'écosystème vin et nos travaux montrent clairement son impact positif sur les caractéristiques organoleptiques des vins. Cette espèce pourrait donc être une bonne candidate pour des fermentations mixtes avec *S. cerevisiae*.

#### Figure 4

Libération du 3SH par les levures non-*Saccharomyces* et une souche de *S. cerevisiae* dans des moûts de Sauvignon blanc à mi-fermentation, moyenne des répétitions, analyse de variance,  $\alpha=0,05$ .



Nous démontrons, et ce pour la première fois, que les levures non-*Saccharomyces* peuvent biotransformer les précurseurs S-conjugués à la cystéine en arôme, et ce malgré une très faible aptitude fermentaire. Il est important désormais de pouvoir évaluer dans quelle mesure les levures non-*Saccharomyces* peuvent contribuer; dans la limite de leur représentation au sein de l'écosystème fermentaire, aux arômes variétaux type buis et surtout pamplemousse dans les vins. Il serait en effet intéressant de quantifier la contribution véritable des levures non-*Saccharomyces* à l'arôme des vins lors du démarrage de la FA, alors que leur population est maximale (10% de la population levure totale). L'analyse des thiols volatils peut alors constituer alors un indicateur original de cette contribution.

## CONCLUSION

L'écosystème levurien est majoritairement colonisé par les levures non-*Saccharomyces* pendant les premières étapes de la vinification. La population des non-*Saccharomyces* reste plutôt stable pendant la MPF et augmente pour atteindre sa population maximale dans la première moitié de la FA, avant de décroître vers la fin de la FA. Pendant les trois millésimes d'observation, nous avons isolé 14 genres, 26 espèces et placé en collection

232 individus. On constate globalement une microflore plus diverse au début de la MPF. Les populations *Saccharomyces cerevisiae*, minoritaires dans le moût dès l'encuvage, colonisent le milieu pendant la MPF et sont déjà dominantes au moment du levurage. En ce qui concerne la population levurienne non-*Saccharomyces*, il est possible de mettre en évidence une dynamique des espèces. Selon le millésime et l'échantillon, *Candida zemplinina* domine la communauté des NS à l'encuvage avant de décroître au profit de *Hanseniaspora uvarum* en fin de MPF et redevenir majoritaire en fin de FA.

Nous nous sommes également intéressés aux facteurs intervenant dans le fonctionnement de l'écosystème lors de la FA et avons mis en évidence plusieurs modes d'interaction existant entre espèces. Des facteurs nutritifs et/ou toxiques peuvent influencer la cohabitation entre levures *Saccharomyces cerevisiae* et non-*Saccharomyces*, et être à l'origine de compétitions par rapport à la croissance dans un écosystème donné. La colonisation du milieu par *Saccharomyces cerevisiae* permet de limiter, par un phénomène d'occupation de l'espace disponible, le développement de certaines levures non-*Saccharomyces*, c'est le cas de *Brettanomyces bruxellensis*. Mais une interaction encore plus frappante a été mise en évidence pour le couple *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora uvarum*, se traduisant par la mort précoce de cette dernière. Nos travaux ont montré que cette interaction considérée comme une forme d'amensalisme est indépendante des facteurs toxiques ou nutritifs. Un contact physique est obligatoire pour que l'interaction de type « cell-cell contact » entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora uvarum* ait lieu.

Nous avons également étudié l'incidence de plusieurs facteurs sur la dynamique des espèces pendant la MPF et la FA. L'influence du moment d'addition de levures sélectionnées en relation avec la MPF a été évaluée. Un levurage précoce dès l'encuvage entraîne une population levurienne non-*Saccharomyces* plus basse en fin de fermentation alcoolique qu'un levurage tardif (après MPF). L'apport d'oxygène lors de la MPF ne modifie pas la dynamique ni la diversité des levures. Concernant le facteur température, il apparaît qu'une température de 10°C est suffisante pour contrôler la croissance levurienne. D'un point de vue microbiologique, il n'est donc pas nécessaire de refroidir les moûts en dessous de 10°C. Le choix de la température va également influencer la nature des espèces présentes dans l'écosystème.

La troisième partie de nos travaux a consisté à mettre en place une méthode rapide et « culture indépendante », la PCR en temps réel, afin de pouvoir détecter et quantifier certaines espèces non-*Saccharomyces*. Nous avons à cet effet développé des amorces spécifiques pour quantifier directement dans les moûts ou les vins les espèces *Candida zemplinina*, *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Torulaspora delbrueckii*, mais également *Hanseniaspora (uvarum et guilliermondii)* et *Saccharomyces*.

La bibliographie décrit les levures non-*Saccharomyces* et leur capacité à contribuer aux caractéristiques organoleptiques des vins. Dans une approche détaillée, nous avons évalué cette aptitude des levures non-*Saccharomyces* à contribuer à la structure aromatique des vins et plus particulièrement aux notes variétales par la libération de thiols volatils. Nous avons ainsi constaté que plusieurs espèces non-*Saccharomyces* ont une forte capacité à libérer le 3SH (pamplemousse) et le 4MSP (odeur de buis). Parmi ces espèces, *Metschnikowia pulcherrima* s'est révélée avoir un fort potentiel. Il est important désormais de pouvoir quantifier l'impact réel de cette population minoritaire sur la libération des thiols dans le cas de la vinification de certains cépages blancs.

D'un point de vue plus général, nos travaux amènent un questionnement plus global concernant l'écosystème levurien. Existe-t-il une relation entre diversité levurienne (au niveau interspécifique ou intraspécifique) durant le processus d'élaboration des vins et leur qualité organoleptique ? Faut-il orienter les itinéraires techniques afin de limiter le développement d'une flore hétérogène ou au contraire être plus permissif concernant le développement des levures non-*Saccharomyces* (cas de la mise en œuvre de la MPF avec levurage tardif par exemple) ? Nos premiers résultats montrent en tout cas que les levures non-*Saccharomyces* ne sont pas systématiquement à ranger dans la catégorie de « levures indésirables » dites d'altération. En utilisant la collection de levures mise en place, la reconstitution de la diversité de la flore non-*Saccharomyces* pendant la MPF de façon contrôlée au laboratoire doit permettre d'évaluer son impact sur la qualité des vins et de mieux comprendre si cette complexité microbienne est nécessaire pour obtenir un produit final plus complexe.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Malfeito-Ferreira, M., M. Tareco, and V. Loureiro, *Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 38(2-3): p. 143-55.
2. Sipiczki, M., *Candida zemplinina sp nov., an osmotolerant an psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003. 53: p. 2079-2083.
3. Bely, M., et al., *Impact of mixed Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 122(3): p. 312-20.
4. de Llanos Frutos, R., M.T. Fernandez-Espinar, and A. Querol, *Identification of species of the genus Candida by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004. 85(3): p. 175-85.
5. Gonzalez, S.S., E. Barrio, and A. Querol, *Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain)*. Journal of Applied Microbiology, 2007. 102(4): p. 1018-25.
6. Lopandic, K., et al., *Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines*. FEMS Yeast Research, 2008.
7. Di Maro, E., D. Ercolini, and S. Coppola, *Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape*. International Journal of Food Microbiology, 2007. 117(2): p. 201-210.
8. Nisiotou, A.A., A.E. Spiropoulos, and G.J. Nychas, *Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. 73(21): p. 6705-13.
9. Xufre, A., et al., *Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations*. International Journal of Food Microbiology, 2006. 108(3): p. 376-384.
10. Hierro, N., et al., *Diversity and evolution of non-Saccharomyces yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration*. FEMS Yeast Research, 2006. 6(1): p. 102-111.
11. Baleiras Couto, M.M., R.G. Reizinho, and F.L. Duarte, *Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 102(1): p. 49-56.
12. Mills, D.A., E.A. Johannsen, and L. Cocolin, *Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. 68(10): p. 4884-4893.
13. Fernandez, M.T., J.F. Ubeda, and A.I. Briones, *Comparative study of non-Saccharomyces microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods*. FEMS Microbiology Letters, 1999. 173(1): p. 223-229.
14. Hansen, E.H., et al., *The effect of oxygen on the survival of non-Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology, 2001. 91(3): p. 541-7.
15. Perez-Nevaldo, F., et al., *Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 2006. 108(3): p. 336-345.
16. Sieuwerts, S., et al., *Unraveling microbial interactions in food fermentations; from classical to genomics approaches*. Applied and Environmental Microbiology, 2008: p. AEM.00113-08.
17. Pretorius, I.S., *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*. Yeast, 2000. 16(8): p. 675-729.
18. Andorra, I., et al., *Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques*. Food Microbiology, 2008. 25(7): p. 849-856.
19. Divol, B. and A. Lonvaud-Funel, *Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine*. Journal of Applied Microbiology, 2005. 99(1): p. 85-93.
20. Viana, F., et al., *Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits*. Food Microbiology, 2008. 25(6): p. 778-785.

21. Pineau, B., *Contribution à l'étude de l'arôme fruité spécifique des vins rouges de Vitis vinifera L.cv. Merlot noir et Cabernet-Sauvignon*, in *Faculté d'oenologie*. 2007, Université Victor Ségalen Bordeaux 2: Talence.
22. Murat, M.-L., et al., *Effect of Saccharomyces cerevisiae Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2001. 52(2): p. 136-139.
23. Murat, M.-L., *Recherche sur la vinification des vins rosés et claires de Bordeaux*, in *Faculté d'oenologie*. 2001, Université Bordeaux 2: Bordeaux.
24. Masneuf-Pomarède, I., et al., *Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines*. *International Journal of Food Microbiology*, 2006. 108(3): p. 385-90.
25. Masneuf, I., et al., *Hybrids Saccharomyces cerevisiae x Sacharomyces bayanus var. uvarum having a high liberation ability of some sulfur varietal aromes of Vitis vinifera Sauvignon blanc wines*. *Journal International des Science de Vigne et du Vin*, 2002. 36(4): p. 205-212.
26. Howell, K.S., et al., *Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by Saccharomyces cerevisiae commercial wine strains*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004. 240(2): p. 125-129.

Tous les travaux des Lauréats peuvent être consultés  
à l'adresse **[www.academie-amorim.com](http://www.academie-amorim.com)**

Le prochain concours de l'Académie AMORIM,  
ouvert dès janvier 2010, sera annoncé sur ce même site.



A large, light gray, stylized letter 'A' graphic that spans most of the width of the page. It has a rough, hand-drawn texture. The word 'ACADÉMIE' is positioned to the left of the 'A', and 'MORIM' is to the right.

ACADÉMIE A MORIM

[www.academie-amorim.com](http://www.academie-amorim.com)

Tél : 01 40 26 11 40 - Fax : 01 40 26 11 61

Email : [contact@academie-amorim.com](mailto:contact@academie-amorim.com)