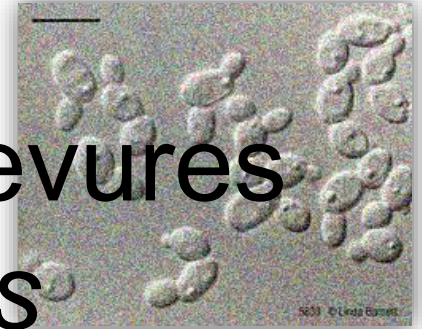


# Intérêt œnologique des levures non-*Saccharomyces*



Focus sur *Metschnikovia pulcherrima* pour  
l'amélioration des qualités organoleptiques du vin

Raphaëlle Tourdot-Maréchal



**P A M**

**UMR Procédés Alimentaires Microbiologiques  
Équipe Vin ALiments Micro-organismes Stress**

Société AEB/Conseil Régional Bourgogne Franche-Comté



**RÉGION  
BOURGOGNE  
FRANCHE  
COMTE**

## « non-Sacch » ... Quèsaco ?

*Acetobacter spp.*  
*Asaia krunthepensis*  
*Bacillus spp.*  
*Enterococcus spp.*  
*Gluconobacter spp.*  
*Lactobacillus spp.*  
*Leuconostoc spp.*  
*Pediococcus spp.*  
*Rhizopus spp.*  
*Oenococcus spp.*  
*Weiseilla spp.*

**10<sup>2</sup> à 10<sup>4</sup> UFC/g**

### Bactéries

50 genres isolés (Barata et al., 2012)



*Acremonium spp.*  
*Alternaria spp.*  
*Aspergillus spp.*  
*Botrytis cinera*  
*Cladosporium spp.*  
*Erysiphe necator*  
*Fusarium spp.*  
*Penicillium spp.*  
*Rhizopus spp.*  
*Plasmopara viticola*

### Champignons filamenteux

**10<sup>3</sup> à 10<sup>6</sup> UFC/g**

(Diguta, 2010)

Plus de 70 genres identifiés  
(Rousseaux et al., 2014)

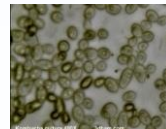
*Aureobasidium pullulans*  
*Candida spp.*  
*Hanseniaspora spp.*  
*Issatchenkia spp.*  
*Metschnikowia spp.*  
*Pichia spp.*  
*Starmerella spp.*  
*Torulasporea spp.*

### Levures

**10<sup>2</sup> à 10<sup>5</sup> UFC/g**

(Renouf et al., 2005; Barata et al., 2012)

Très faible fréquence de détection sur baies de *Saccharomyces cerevisiae*



29 genres et 90 espèces différents identifiés  
(Sadoudi, 2014 ; Pinto et al., 2014)

## Pourquoi s'intéresser aujourd'hui aux levures non-Saccharomyces ?

Considérées comme une flore d'altération, avec production d'une forte acidité volatile et/ou de composés aromatiques non désirés (Fleet and Heard, 1993)

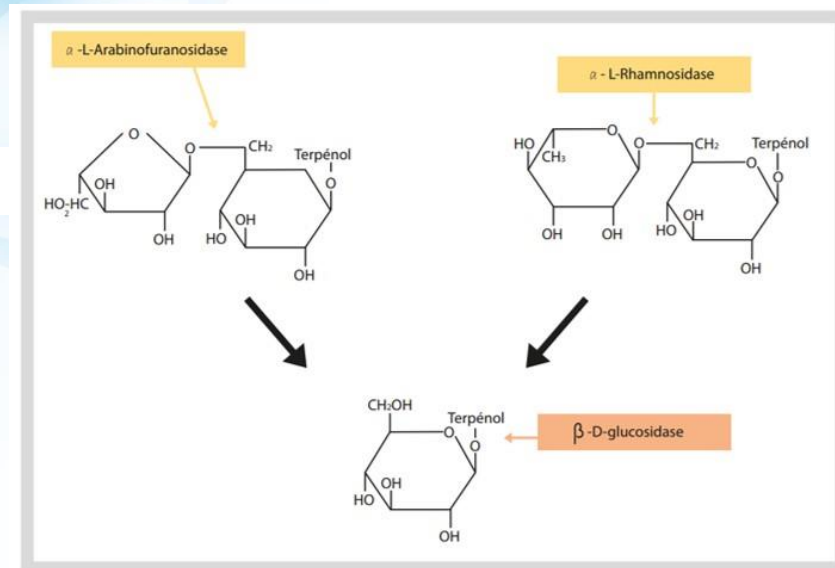
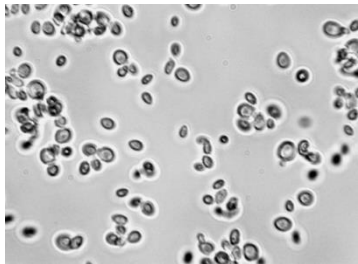
Contribution positive de leur métabolisme mise en évidence depuis les années 2000

1990 ... 2000 ... 2017

### Focus sur *Metschnikowia pulcherrima* (Mp)

- Levure ascomycète faiblement fermentaire (production d'éthanol : 5-6% v/v ethanol)
- Isolée sur les fruits, fleurs et nectars
- **Sécrétion d'enzymes :**  
Protéases acides potentiellement impliquées dans la dégradation de protéines du vin (Lagace and Bisson, 1990)

**$\beta$ -glucosidase** potentiellement impliquée dans la libération de composés aromatiques à partir des précurseurs présents dans le jus de raisin (Günata et al., 1990)



Mécanisme de libération des monoterpénols à partir de leurs précurseurs glycosidiques (Günata *et al*, 1990).

# Demande de l'entreprise : sélectionner de nouvelles souches NS pour une nouvelle pratique d'inoculation des moûts (inoculation séquentielle)

## Méthodologie mise en œuvre :

### ● Sélection de souches de levures NS

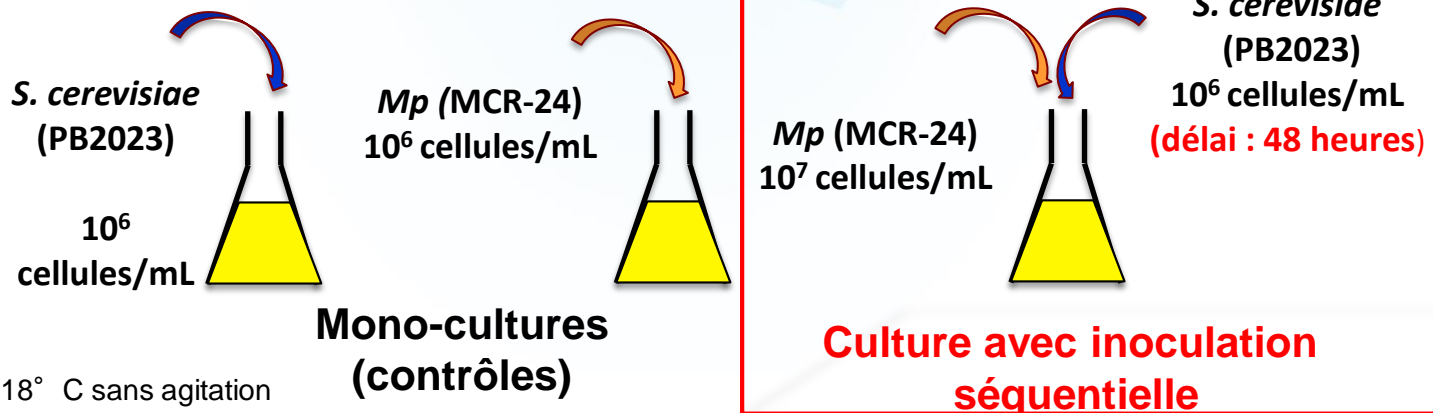
En septembre 2010 (Régions Bourgogne et Centre-Loire) : isolement et identification (PCR ITS RFLP /séquençage de domaine D1/D2 de l'ADNr 26S) de 883 isolats levures NS

→ 2 souches de *Metschnikowia pulcherrima* isolées sur Pinot noir

→ 1 souche codée **MCR-24** retenue pour l'inoculation séquentielle d'un moût.

### ● Micro-vinifications (350 mL) et mini-vinifications (20 L) sur Sauvignon blanc

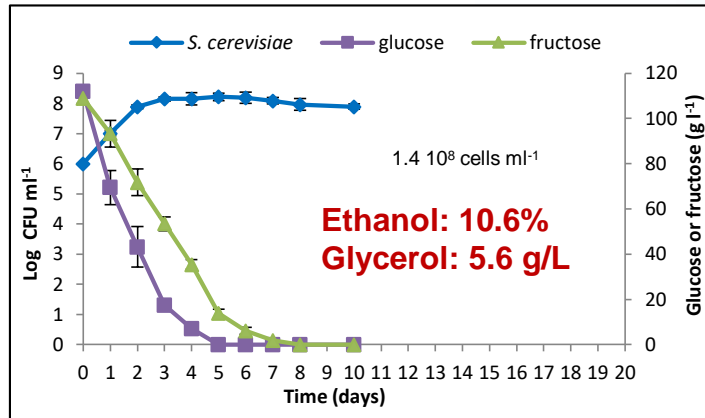
(112 g l<sup>-1</sup> glucose, 109 g l<sup>-1</sup> fructose, 3.1 g l<sup>-1</sup> acide L-malique, 378 mg l<sup>-1</sup> azote total, pH 3.35 - supplémenté en SO<sub>2</sub> (30 mg l<sup>-1</sup>))



Fermentations à 18° C sans agitation

# Cinétiques de fermentation : production des principaux métabolites

## a) *S. cerevisiae* PB2023 mono-culture

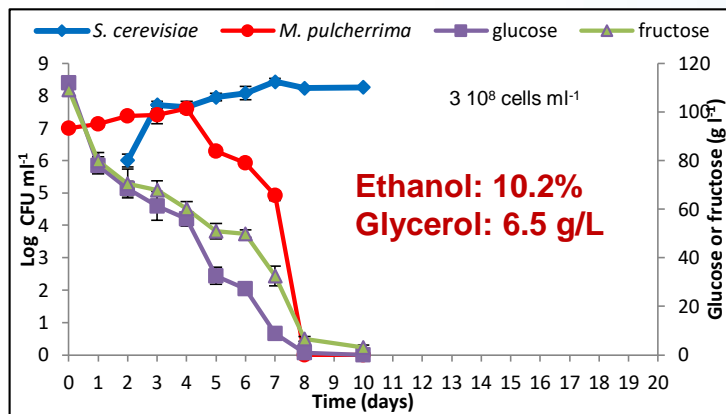


La présence de MCR-24 n'influence pas le temps total de fermentation (approx. 9 jours).

La concentration finale en éthanol est légèrement plus faible (10.2 % v/v).

La concentration en glycérol est significativement plus élevée (+16 %).

## b) *Mp/S. cerevisiae* en culture séquentielle

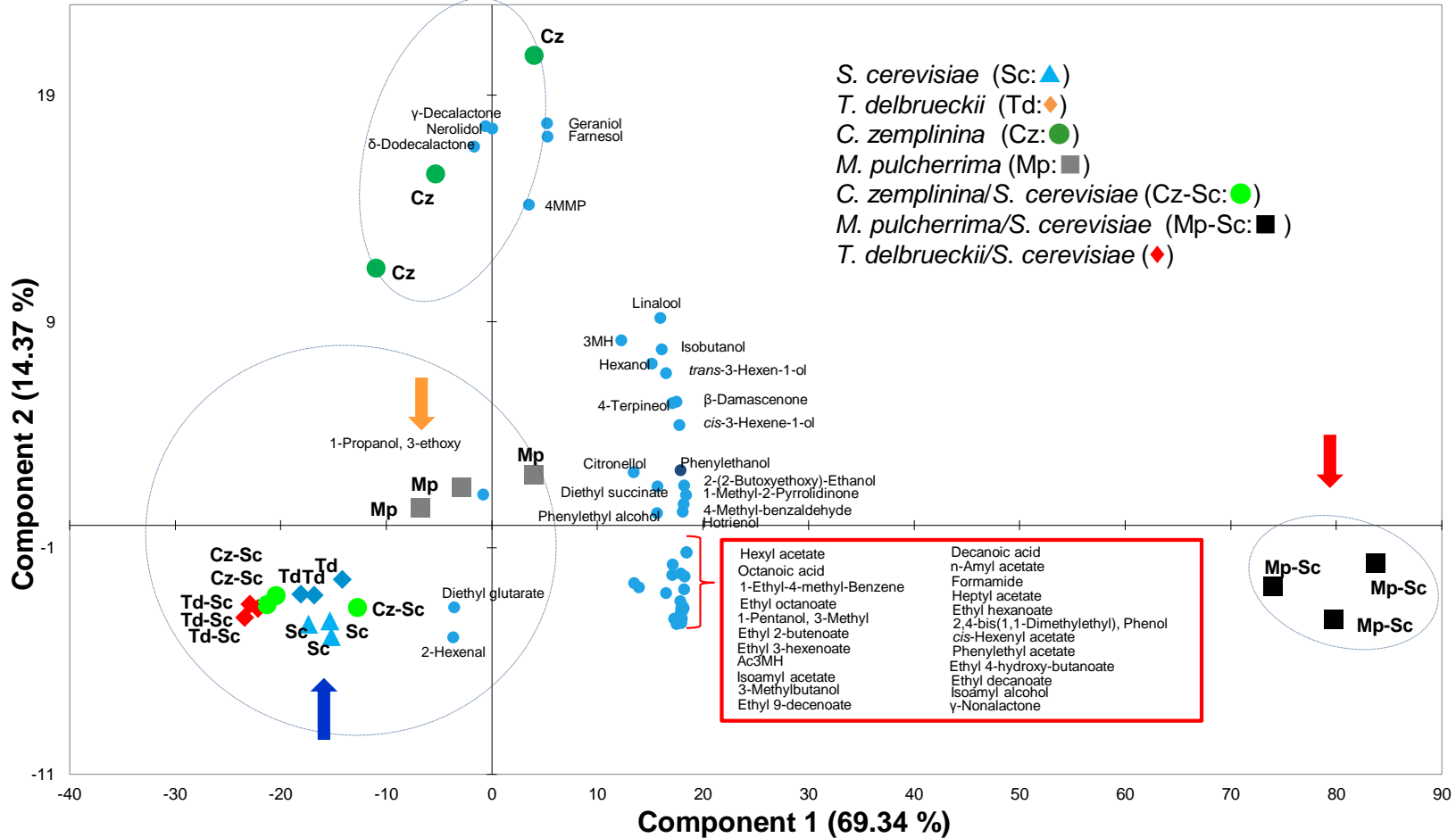


Phénomènes d'interactions entre *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* (mort de MCR-24 induite par l'inoculation avec *S. cerevisiae*).

La fermentation séquentielle entraîne une diminution de 37% de la concentration en acide acétique (0.22 g/L) comparée à une mono-culture de *S. cerevisiae* (0.35 g/L).

# Quantification de 44 composés volatils (fin de fermentations)

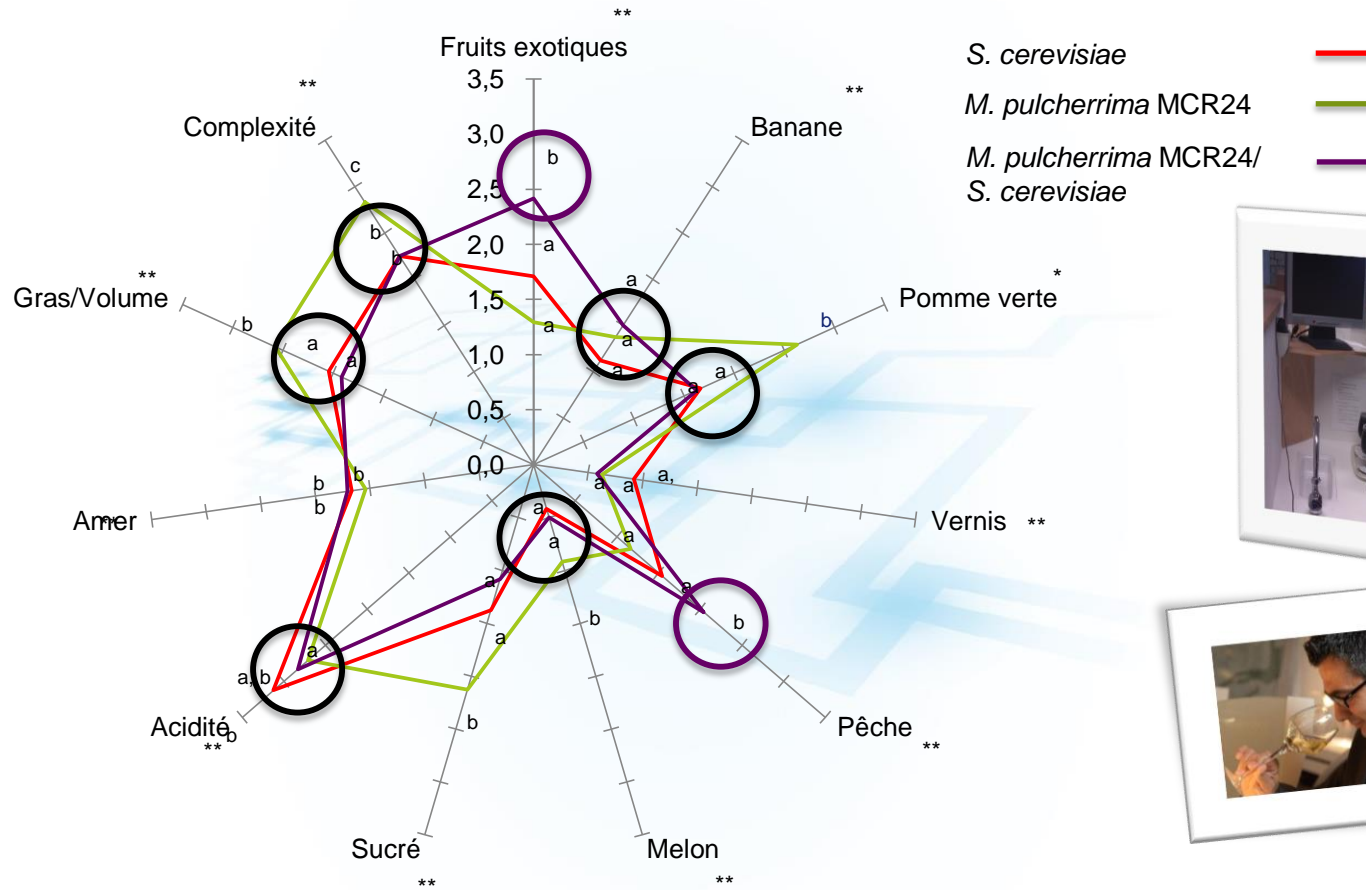
Biplot (PC1 vs PC2 : 83.71 %)



Biplot of the principal components analysis (PC 1 vs. PC 2) of metabolites profiles normalised to the biomass. Ellipses represent clusters obtained from HCA (Sadoudi et al., 2012)



# Quid sur l'impact de l'inoculation séquentielle sur le profil sensoriel des vins de Sauvignon blanc ?

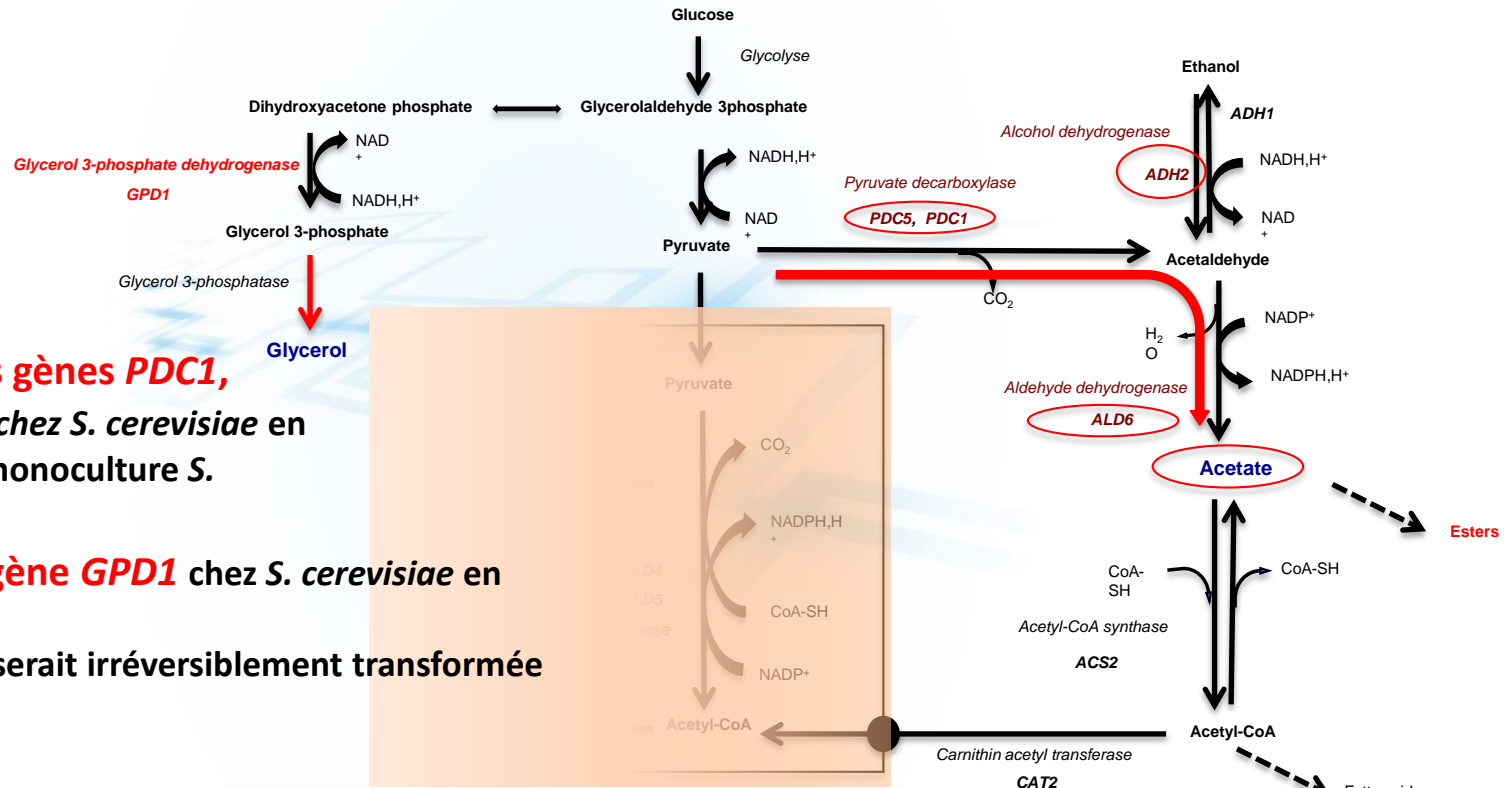


**Exacerbation des qualités sensorielles du vin sans affecter sa "signature" organoleptique (production accrue des esters volatils)**

**→ Comment expliquer l'effet positif de *M. pulcherrima* ?**

# Quantification des gènes impliqués dans le PDH bypass et la fermentation glycéro-pyruvique chez *S. cerevisiae*

Cinétiques d'expression établies grâce à la technique de RT-qPCR et **quantification relative ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )** chez *S. cerevisiae* en culture séquentielle/mono-culture.



Principaux gènes impliqués dans la voie PDH by-pass et la production du glycérol

► Surexpression des gènes *PDC1*, *PDC5*, *ALD6*, *ADH2* chez *S. cerevisiae* en culture séquentielle/monoculture *S. cerevisiae*

► Surexpression du gène *GPD1* chez *S. cerevisiae* en culture séquentielle  
Une partie du glucose serait irréversiblement transformée en glycérol

→ La présence de MCR-24 module les flux métaboliques impliqués dans la formation d'ac. acétique et de glycérol chez *S. cerevisiae*  
(hypothèse : consommation d'O<sub>2</sub> par *Mp* / régulation du potentiel Redox chez *Sc*)



## Les apports de notre collaboration avec la Société AEB

### ● Pour la Société AEB :

Apport d'une réponse technique et scientifique à la demande d'alternatives par les professionnels au mono-levurage pratiqué en œnologie.

Souche déposée – et préparations commercialisées depuis 3 ans par AEB (Primaflora VR©)

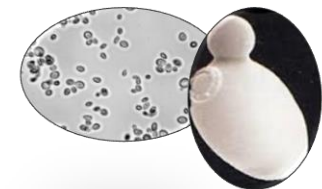
### ● Pour l'équipe VALMiS (UMR PAM) :

Amplificateur de l'étude des interactions levures/levures dans Un contexte œnologique avec le but de développer les outils moléculaires (transcriptomiques et métabolomiques) pour affiner la maîtrise de l'impact d'une inoculations séquentielle sur :

le métabolisme de la levure fermentaire *S. cerevisiae* ;

les conséquences de la réorientation du métabolisme de *S. cerevisiae* sur le profil aromatique des vins.

Générateur à l'IUVV une collection de souches de non-*Saccharomyces* dont nous évaluons aujourd'hui les potentiels.



## Résultats publiés - valorisation

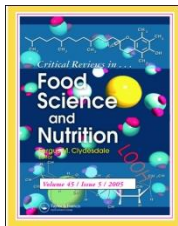


Food Microbiology

Volume 32, Issue 2, December 2012, Pages 243–253

**Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts**

Mohand Sadoudi, Raphaëlle Tourdot-Maréchal, Sandrine Rousseaux, et al.



**Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions**

[Youzhong Liu](#), [Sandrine Rousseaux](#), [Raphaëlle Tourdot-Maréchal](#), [Mohand Sadoudi](#), [Régis Gougeon](#), [Philippe Schmitt-Kopplin](#) et al. Pages 856-873 | version posted online: 11 Jun 2015, Published online: 11 Jun 2015



Diffusion auprès des professionnels (2 articles en 2013 et 2014)

**Les co-acteurs de ce travail :**

**Mohand Sadoudi, Sandrine Rousseaux, Hervé Alexandre et Vanessa David**