Inventaire de la diversité des levures en fermentation alcoolique en situation Bio

Auteurs : Lucile Pic[1], Daniel Granès[2], Pozzo di Borgo Caroline [3]
[1] : responsable Expérimentations Œnologie, Groupe ICV, La Jasse de Maurin 34970 Lattes,
[2] : directeur scientifique, Groupe ICV, La Jasse de Maurin 34970 Lattes,
[3] : œnologue-consultante, Groupe ICV, ZI Saint Cézaire, Chemin du Chai 30 900 NIMES,

De nombreuses études se sont attachées à étudier l'écologie des différentes espèces de levures au cours de la fermentation (Gutierrez et al., 1999; Shütz et Gafner, 1993; Querol et al, 1994; Vezinhet et al, 1992, Renouf et al 2006…), notamment dans des situations de non levurage. Il est couramment admis que le démarrage de la fermentation est réalisé par des levures non-*Saccharomyces,* fermentaires mais peu résistantes à l'éthanol (telles que Pichia *sp*, C*andida sp* et *Kloeckera apiculata appelée aussi Hanseniospora Uvarum, Torula sp*). Ces levures vont rapidement être inhibées par leur propre production d'éthanol alors que les levures plus résistantes à l'éthanol se développent (telles que les levures *Saccharomyces cerevisiae*).
La succession et la diversité de ces flores est perçue par certains comme un gage de qualité et de complexité aromatique pour les vins (Mateo et al, 1991; Fugelsang 1996; Heard 1999), conduisant ainsi certains vinificateurs à opter pour le non-levurage. Les risques de dérives analytiques (production d'acidité volatile, d'acétate..) liés à un développement prolongé des non *Saccharomyces* ont été décrits depuis longtemps (Benda 1982; Lafon Lafourcade 1983; Schütz et Gafner 1993). Dès 1996, Delteil publiait une étude sur 5 caves de la vallée du Rhône septentrionale mettant en évidence l'absence de levure dominante à l'échelle d'une cuve et l'absence de levure présente dans toutes les cuves de la cave. Dans l'étude que nous avons conduite en 2011 et 2012, nous nous sommes intéressés aux équilibres et successions des différents micro-organismes, en situation réelle, dans des cuvées issues de **parcelles conduites en agriculture biologique** et vinifiées sans adjonction de SO_2 ni de levures sélectionnées. Nous avons pour cela choisi un site du sud de la France où le levurage par des LSA n'est plus pratiqué depuis plus de 15 ans.

Matériel et méthode

Sur deux millésimes consécutifs, nous avons suivi 5 cuvées. Chaque cuvée est composée du raisin issu d'une seule et unique parcelle. Chacune de ces 5 parcelles est récoltée à des périodes différentes réparties entre le début et la fin des vinifications.

Tableau 1 : Caractéristiques des cuvées suivies en 2011 et 2012

Cuvée	Cépage	Période de vinification	Type de vinification
VdPB	syrah	Début vendange	Rouge macération longue
DdF	Syrah-Grenache	Début vendange	Rouge macération longue
DdS	Syrah-Mourvèdre	Milieu vendange	Rouge macération longue
LC	Grenache	Fin de vendange	Rouge macération longue
Blanc	Bourboulenc	Milieu vendange	Blanc

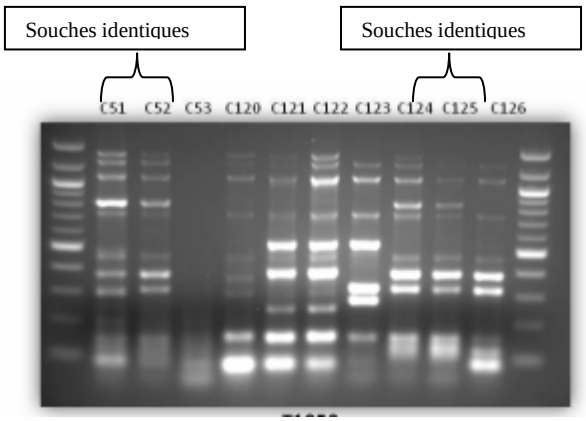
Les raisins rouges sont vinifiés en macération traditionnelle longue (<15 jours) et le raisin blanc en pressurage direct, sans débourbage.
Pour chacune de ces 5 cuvées, des prélèvements ont été effectués 24 heures après encuvage (début fermentation alcoolique), après 20 à 30 points de perte de densité (mi fermentation alcoolique) et à densité comprise entre 1020 et 1000 (Fin fermentation alcoolique).
Pour chacun des prélèvements effectués, nous avons réalisés 4 mises en culture sur milieu gélosé. Deux milieux ont été employés : un milieu YEPD (Milieu non Spécifique permettant le développement

de toutes les levures) et un milieu YEPD + cycloheximide 50mg/l (Milieu sélectif ne permettant pas le développement des levures *Saccharomyces*). Pour chaque milieu deux niveaux de dilution des échantillons ont été mis en culture. L'ajout de biphényl à 150mg/l dans les milieux de culture a permis, pour les échantillons de début de fermentation alcoolique, d'éviter le développement parasite d'éventuelles moisissures.

Le comptage de l'ensemble des boites a ainsi permis de dénombrer les levures totales et les levures non *Saccharomyces* à chacun des stades de la fermentation alcoolique. Pour chaque condition de mise en culture, nous avons isolé et purifié 10 à 20 colonies, en veillant à ce que chaque type macroscopique de colonie soit représenté, ce qui représente 30 colonies par stade et par cuve. Dix de ces isolats ainsi obtenus ont ensuite été analysés par PCR par les laboratoires de Microflora et de l'IFV.

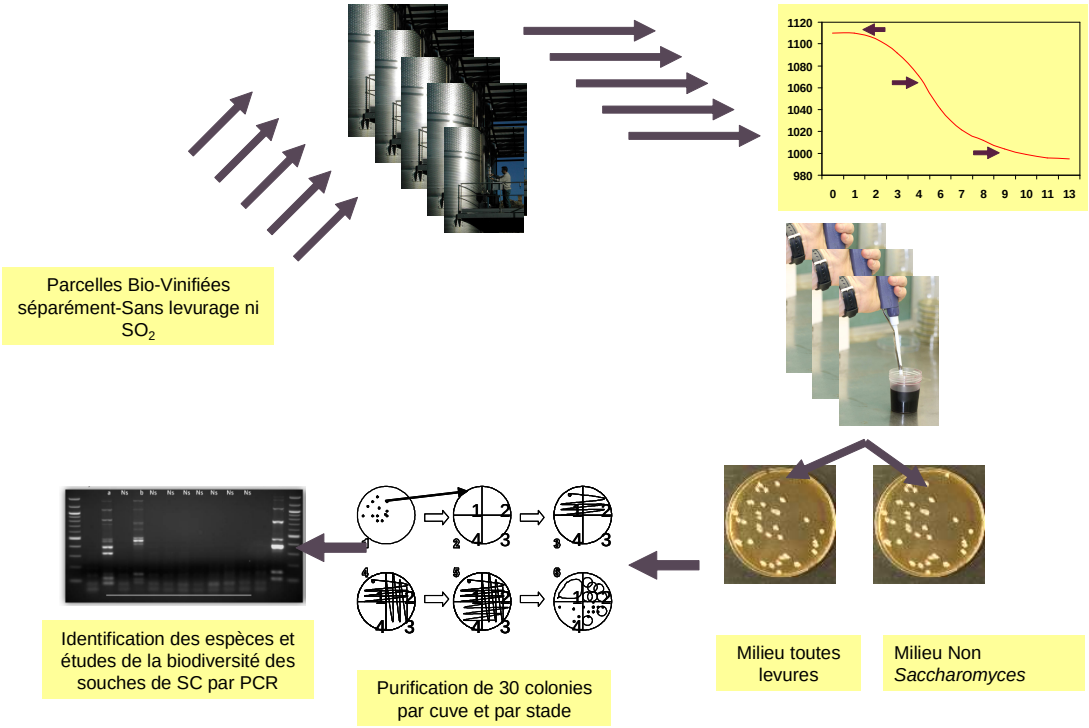
Une première analyse (par PCR sur séquence delta de Ty1) sur l'ADN total extrait de chaque clone isolé permet 1) de déterminer l'appartenance du clone ou non à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et 2) de comparer entre eux les profils génétiques de deux clones afin de définir si ils représentent des souches différentes ou non (Figure 1).

Figure 1 : Exemple de Profils génétiques interdelta de 10 clones isolés à mi fermentation alcoolique d'une même cuve. 9 clônes sur 10 sont de l'espèces *Saccharomyces*. Les clones C120, C123, C126 sont des souches distinctes. Les clones C51, C52, C124 et C125 représentent la même souche



Dans un second temps, les clones ayant été identifiés comme non *Saccharomyces*, font l'objet d'une amplification de ADNr 5.8s, afin que leur profil soit comparé à ceux des principales espèces non *Saccharomyces*.
Ces analyses génétiques permettent ainsi d'une part de confirmer la nature *Saccharomyces* / Non *Saccharomyces* des levures, mais aussi d'identifier 1) les différentes souches de *Saccharomyces* en présence ainsi que 2) les principales espèces non *Saccharomyces* isolées de nos prélèvements.

Figure 2 : Différentes étapes de l'étude de la diversité des flores des cuves en Bio



Résultats

- **Niveaux total de flore spontanée**

L'analyse des niveaux de levures viables en début de fermentation alcoolique montre que les niveaux de flore levurienne spontanée sont compris entre 10^5 et 10^7 UFC/ml. Ce nombre augmente globalement au cours des vendanges : l'environnement du chai se charge en micro-organismes au cours des vendanges. Ces résultats sont en accord avec les différents travaux sur ce sujet (IFV, Itinéraire n°18 -2008). Le millésime a aussi un effet net sur le niveau global de flore spontanée : l'état sanitaire du raisin en 2011 était moins sain qu'en 2012, favorisant ainsi les flores du raisin (Mortimer et Polsinelli, 1999). Enfin, nous notons que le type de vinification impacte aussi le niveau de flore levurienne : la cuvée vinifiée en blanc, présente systématiquement des niveaux de population plus faible.

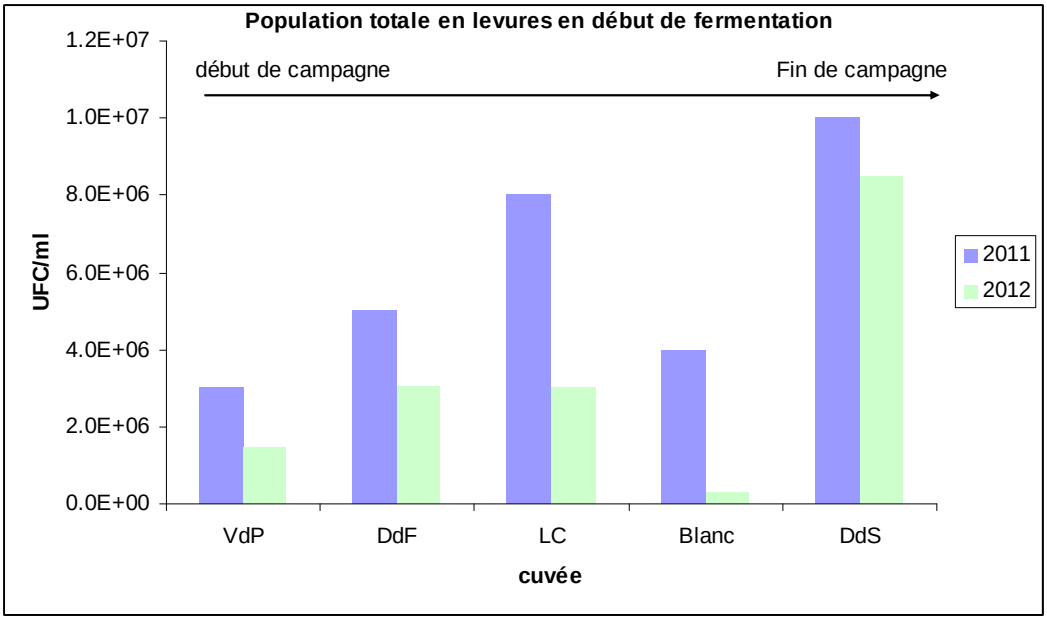
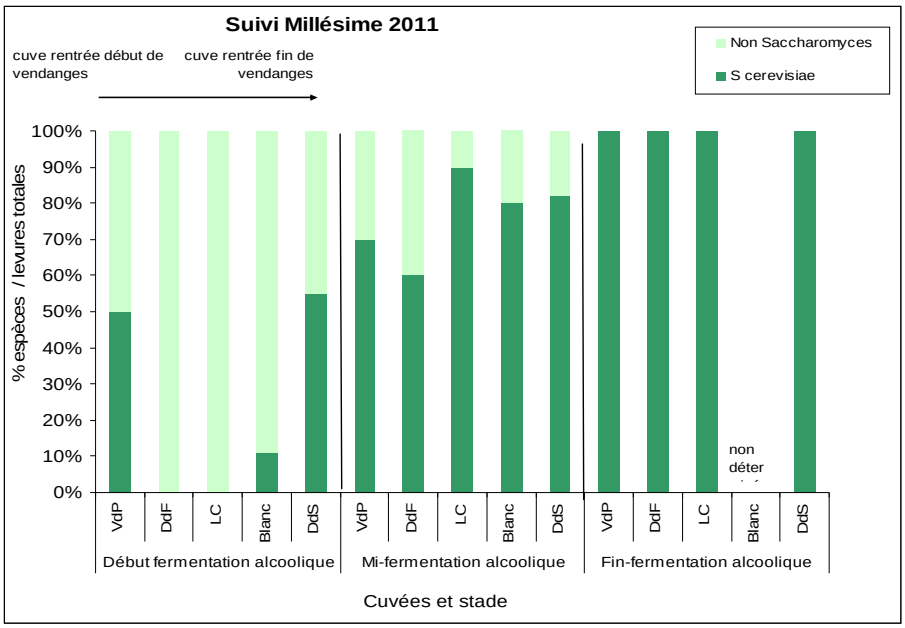


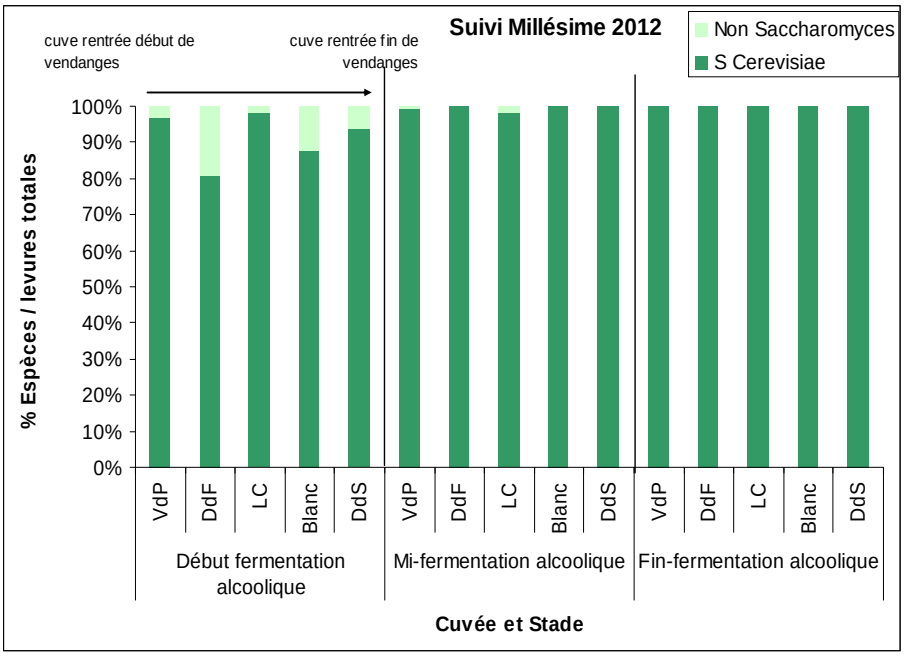
Figure 3 : Impact du millésime et de l'état d'avancement de la campagne sur le niveau de contamination spontanée des jus en début de fermentation alcoolique-

- **Proportion de *Saccharomyces* et non *Saccharomyces* au cours de la vinification**

L'analyse de la répartition entre *Saccharomyces* et non *Saccharomyces* au cours des fermentations alcooliques sur chacune des 5 cuvées au cours des 2 millésimes met en évidence des différences notables entre millésimes (Figure 4).
En 2011, les levures non-*Saccharomyces* sont très présentes, même majoritaires, en début de fermentation alcoolique sur toutes les cuves. Elles se maintiennent à un taux relativement élevé à mi fermentation alcoolique. Ces résultats sont cohérents avec la forte capacité fermentaire récemment identifiée sur certaines souches d'espèces non-*Saccharomyces* comme Torula (Renault 2010).
En 2012, les résultats obtenus sont plus conformes aux comportements généralement relatés dans la bibliographie qui indiquent une disparition rapide des non-*Saccharomyces* face à la pression naturelle exercée par l'apparition de l'alcool dans le milieu.

Figure 4 : Evolution des différentes espèces en présence pendant la FA. 2011 et 2012





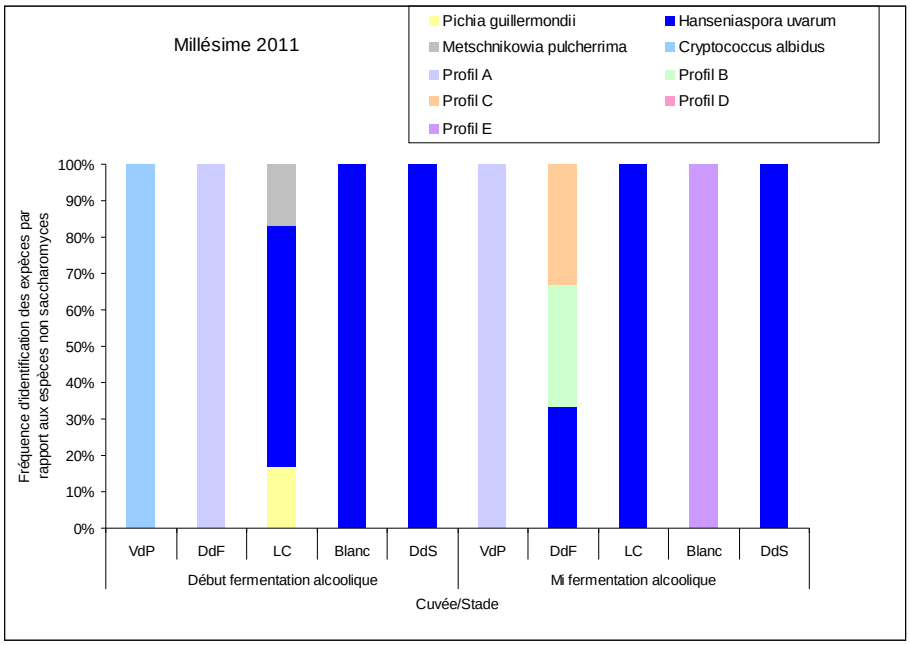
Ces différences entre millésime sont probablement en partie explicables là aussi par les états sanitaires respectifs, induisant ainsi une population spontanée non *Saccharomyces* plus riche en 2011 qu'en 2012. Nos observations confirment en situation Bio ce qui a été relaté dans d'autres régions, à savoir que la diversité des flores sur les baies et dans les moûts dépend d'un nombre varié de facteurs dont la situation géographique et les conditions climatiques (Fleet et al, 1984; Parisch et Carrol, 1985), impliquant ainsi d'éventuelles différences d'un millésime à l'autre.

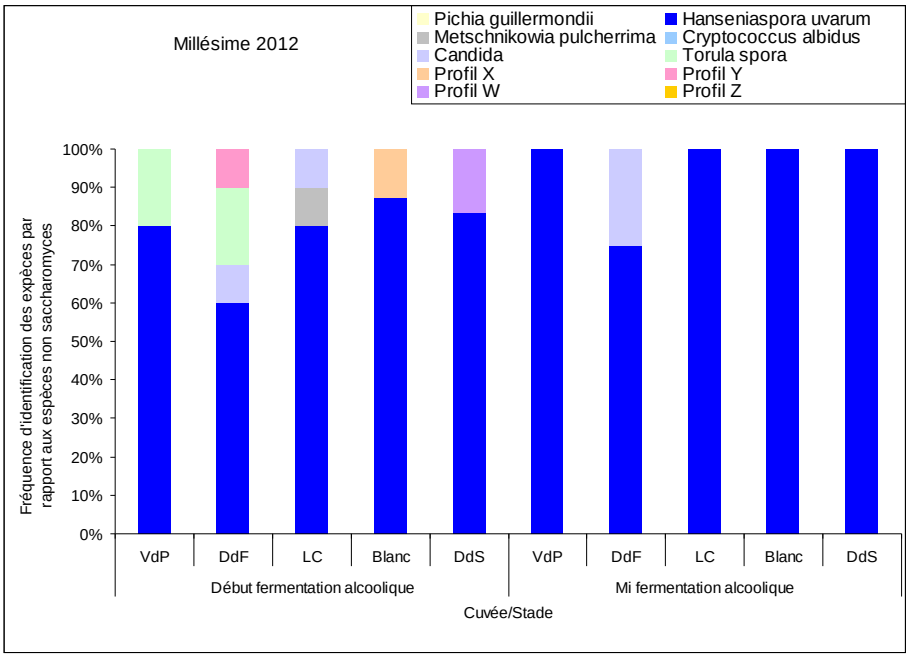
Sur un millésime dont l'état sanitaire est médiocre, en l'absence de levurage et de sulfitage, la fermentation alcoolique peut donc être réalisée en partie par des levures non *Saccharomyces*.

- **Espèces non *Saccharomyces* en présence**

L'identification des principales espèces non *Saccharomyces* isolées sur ces 5 cuvées aux différents stades de la fermentation alcoolique (Figure 5) confirme l'importance de *Hanseniospora Uvarum* au regard des autres espèces. Cependant, là encore des différences nettes entre les deux millésimes apparaissent clairement : alors qu'en 2012 *Hanseniospora Uvarum* est l'espèce non *Saccharomyces* systématiquement majoritaire, en 2011 d'autres espèces sont parfois dominantes dans les cuves. Enfin, nous notons en 2011 la présence de *Cryptococcus albibus*, alors qu'en 2012 ces germes n'ont pas été isolés.

Figure 5 : Espéces NON *Saccharomyces* identifiées dans les 5 cuvées aux différents stades de la fermentation alcoolique.





- **Diversité des souches de *Saccharomyces* en présence**

Les profils PCR qui ont été réalisés illustrent la diversité de la flore en présence. Ainsi en 2011, sur 107 clones de *Saccharomyces* étudiés, 74 souches différentes ont été mises en évidence. En 2012, le rapport est comparable : sur 119 clones de *Saccharomyces* étudiés, 83 souches différentes ont été identifiées (Figure 6).
Ainsi il n'apparaît pas que sur ces 5 cuvées, une "souche de cuve" soit clairement identifiée et ceci sur les deux millésimes de l'étude. A un moment donné et pour une cuve donnée, la flore microbiologique est composée d'un "cocktail" de souches dans lequel 3 à 8 souches *Saccharomyces* différentes peuvent cohabiter, avec parfois des non *Saccharomyces*. Sur les deux années d'étude nous n'avons pu identifier une souche ou un cocktail dominant pour une cuvée donnée.
La Figure 7 illustre, qu'au sein de la cave, les souches en présence à mi fermentation alcoolique dans 3 cuvées sont totalement différentes : aucune souche de *Saccharomyces* n'est commune aux trois cuves à ce stade de la fermentation. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les autres moments de fermentation alcoolique étudiés.
En complément, la Figure 8 met en évidence que pour une cuvée donnée, le cocktail des levures qui se succèdent au cours de la fermentation alcoolique évolue, et que rares sont les souches qui se maintiennent entre les différentes étape en quantité suffisante pour être détectée (exemple de la souche S3 sur la cuvée VdP 2012).

Ces résultats indiquent donc l'absence d'une souche de cuve, voire même d'une souche de cave. Nous sommes face à des écosystèmes complexes dont la composition varie dans le temps et dans l'espace.

Figure 6 : Variété génétique des souches de *Saccharomyces* qui composent la microflore de 5 cuvées à 3 moments de la fermentation alcoolique.

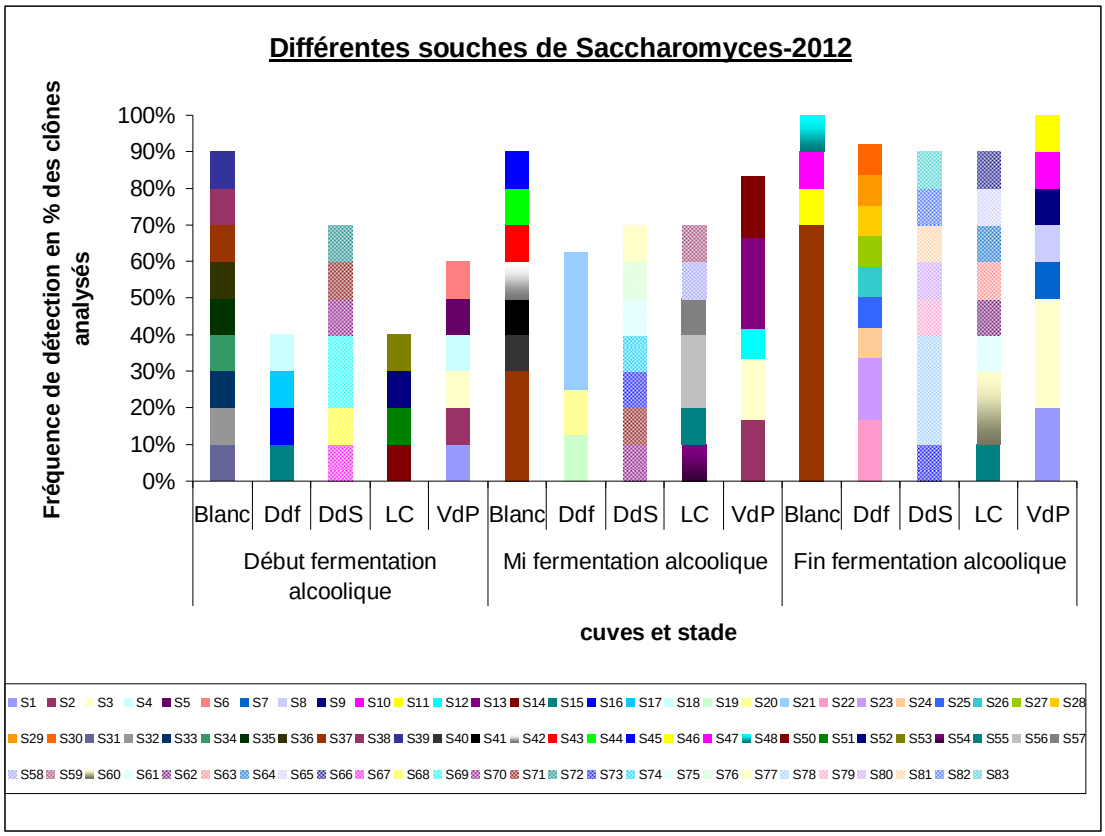


Figure 7 : Comparaison de la variété des souches de *Saccharomyces* présentes à mi fermentation alcoolique entre trois cuvées -2012; S1 = profil génétique SC souche1-Aucun profil n'est détecté dans deux cuves différentes.

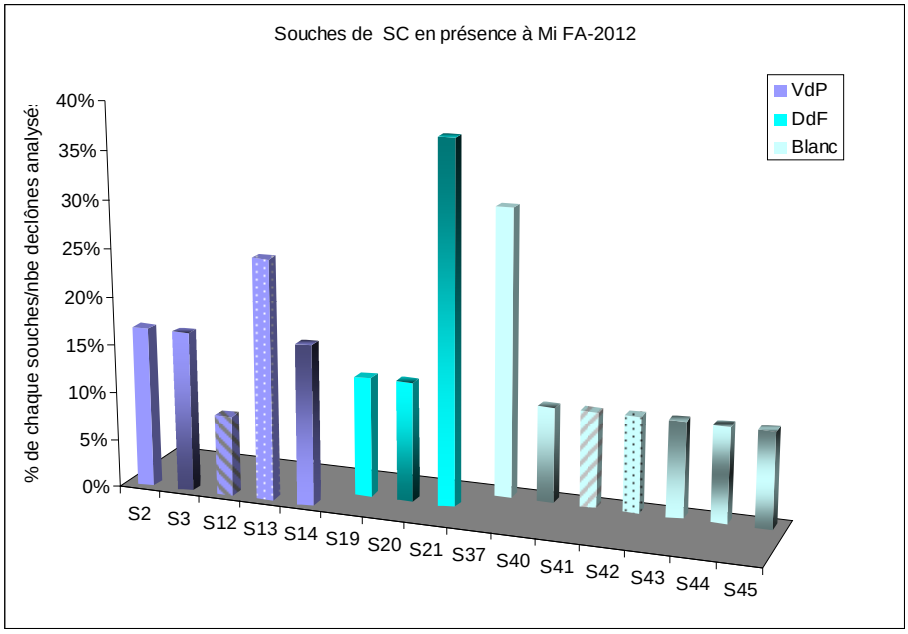
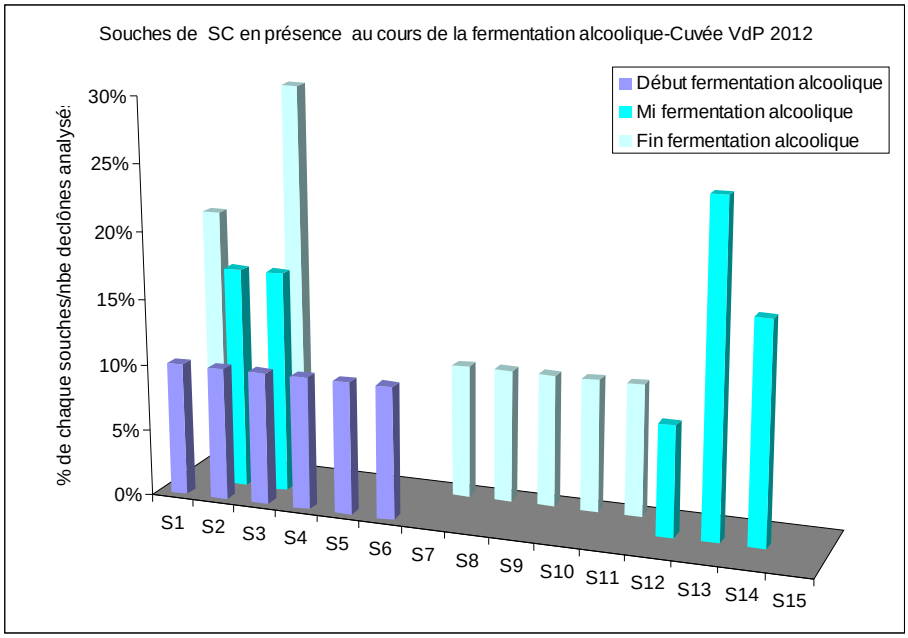


Figure 8 : Comparaison de la variété des souches de *Saccharomyces* présentes au sein d'une cuve au cours de la fermentation alcoolique.2012; Seuls les profils S1, S2 et S3 sont détectées à au moins deux stades différents dans cette cuvée.



Conclusion

Cette étude présente l'originalité d'avoir été conduite pendant deux années consécutives sur des cuvées issues de raisin Bio et vinifiées sans sulfitage ni levurage dans une cave qui ne fait plus appel au levurage depuis maintenant 15 années. Elle a confirmé les résultats de plusieurs études antérieures, notamment la variété des équilibres entre population *Saccharomyces* et non *Saccharomyces*, non seulement d'une cuve à l'autre mais aussi d'un millésime à l'autre. Elle a montré que, sur ce type de vinification, les levures non *Saccharomyces* pouvaient parfois se maintenir à des niveaux non négligeables jusqu'au milieu de la fermentation alcoolique. Grâce aux outils les plus récent de la

biologie moléculaire, nous avons aussi déterminé que sur ce site, il n'était pas possible de mettre en évidence l'existence d'une "levure de cave", voire même d'une "levure de cuve". A chaque stade, c'est un cocktail de plusieurs souches qui est en activité et la diversité de la composition de ce cocktail est en évolution permanente.
De fait, dans une cave de ce profil, il faut garder à l'esprit que tout travail de sélection de la "levure de cave" mis en place sur une cuve en fermentation alcoolique conduira à l'isolement et à la mise en collection d'un seul des composants de ce cocktail et ne pourra que difficilement être représentatif de la composition réelle de la cuve prélevée. Pour être réellement représentatif il faudrait isoler et purifier plusieurs des souches présentes pour pouvoir par la suite re-produire ce cocktail et le réintroduire dans les jus à fermenter.

Références Bibliographiques

Beltran G., Torija M.J., Novo M., Ferrer N., Poblet M., Guillamon J.M., Rozes N., Mas A., 2002. Analysisi of yeast populations during alcoholic fermentation : a six year follow-up study. System.Appl.Microbiol.25, 287-293.

Delteil D., 1996. Ecologie et aptitudes œnologiques des levures indigènes. Revue des œnologues N°81. Octobre 1996.

Fleet G.H., Lafon-Lafourcade S., Ribereau-Gayon P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bactéria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl.Environ.Microbiol.48, 1034-1038.

Fugelsang K.C., 1996. In : "wine microbiology. (Chapman and Hamm eds.) New York, USA.

Heard G., 1999. Novel yeasts in winemaking-looking to the future. Food Australia, 51, 347-352.

IFV, Itinéraire n°18 : Maîtrise des fermentations spontanées et dirigées, 2008

Mateo J.J, Jimenez M., Huerta T., Pastor A., 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. Int. J .Food Microbiolo. 14, 153-160.

Mortimer M., Polsinelli M., 1999. On the origins of wine yeast. Research in Microbiology. Avril 1999, 150(3).

Parrish M.E. and Carroll D.E., 1985. Indigenous yeast associated with Muscadine (*vitis rotundifolia*) grapes and musts. Am. J. Enol. Vitic. 12, 3-31.

Querol A., Barrio E., Ramon D., 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. Int.J.Food Microbiol.21, 315-323

Renault P., Ehsani M., Bely M., 2010. Les NON-*Saccharomyces* et leur expression lors de la fermentation alcoolique. Cas spécifique de *Torulaspora Delbrueckii*. Revue Française d'œnologie. N°242.

Schütz M., Gafner J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. J. Apll.Bacteriol. 75, 551-558.

Vezinhet F., Hallet J., Valade M., Poulard A., 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. Am.J.Enol.Vitic.43, 83-86.

Remerciements : Les auteurs remercient France Agrimer pour son soutien financier, Mathieu Jacques, Chauchard Fanny, Valloo Yoann, Marie Gentil pour leur participation active au pojet ainsi que les Vignerons d'Estézargues pour leur collaboration.