



HAL
open science

Caractérisation phénotypique de l'espèce *Torulaspora delbrueckii* en conditions œnologiques. Application à la co-inoculation avec l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*

Philippe-Emmanuel Renault

► **To cite this version:**

Philippe-Emmanuel Renault. Caractérisation phénotypique de l'espèce *Torulaspora delbrueckii* en conditions œnologiques. Application à la co-inoculation avec l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Ingénierie des aliments. Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), 2010. Français. NNT: . tel-02823720

HAL Id: tel-02823720

<https://hal.inrae.fr/tel-02823720>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n° 1787

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Oenologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 décembre 2010

Par Philippe-Emmanuel RENAULT

Né le 25/04/1983 à Evry (91)

**Caractérisation phénotypique de l'espèce *Torulaspora delbrueckii*
en conditions œnologiques. Application à la co-inoculation avec
l'espèce *Saccharomyces cerevisiae***

Membres du Jury

Professeur Marielle BOUIX.....	Présidente
Professeur Pierre STREHAIANO.....	Rapporteur
Professeur Matthias SIPICZKI.....	Rapporteur
Docteur Benoît COLONNA-CECCALDI.....	Membre
Docteur Marina BELY.....	Directrice de thèse

Résumé

La caractérisation phénotypique de l'espèce *Torulaspora delbrueckii* en conditions œnologiques, à partir de l'étude d'un grand nombre de souches, a permis de mettre en évidence une grande variabilité au sein de cette espèce. En effet, les souches de *T. delbrueckii* présentent des différences au niveau des durées de phase de latence et de fermentation, des capacités biotiques mais aussi des productions d'éthanol (maximum 12% vol.). Cette variabilité se retrouve également pour la production d'acidité volatile, de glycérol et de certains arômes. Ce travail confirme les faibles productions d'acidité volatile et de glycérol de cette espèce et met en évidence une réponse au stress osmotique différente de celle de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Au final, l'espèce *T. delbrueckii* présente une grande « pureté » de fermentation et produit peu de composés indésirables comme le sulfure d'hydrogène, les phénols volatils, l'acétoïne, l'acétaldéhyde et le diacétyl. La réalisation de co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* sur moûts liquoreux, permet une réduction systématique de l'acidité volatile des vins, en comparaison à une fermentation pure de l'espèce *S. cerevisiae*, quelque soit la souche de *T. delbrueckii* utilisée. De plus, la souche *T. delbrueckii* OXT1 1//2 a permis de complexifier la composition aromatique d'un moût sec issu du cépage Sauvignon blanc (esters fermentaires +25%, phényl-2-éthanol +51% et thiols volatils +31%). Enfin, la mise au point d'un fermenteur à double compartiment, avec une séparation physique des levures tout en conservant l'homogénéité du milieu de culture, a permis d'aborder l'étude des interactions entre ces 2 espèces. Des inhibitions de type « cell-cell contact » ont ainsi été mises en évidence.

Mots clés : *Torulaspora delbrueckii*, non-*Saccharomyces*, variabilité phénotypique, co-inoculation, vin, interaction.

Abstract

The phenotypic characterization of *Torulaspora delbrueckii* species in enological conditions, using a large number of strains, showed up a wide variability within this species. Indeed, the strains of *T. delbrueckii* present different fermentative capacities for lag phase and fermentation durations, biotic capacities and ethanol production (up to 12 % vol.). This phenotypic variability is also obtained for the production of volatile acidity, glycerol and certain aroma compounds. This work confirms the low productions of volatile acidity and glycerol of this species and reveals an osmotic stress response distinct from that of *Saccharomyces cerevisiae*. Finally, the *T. delbrueckii* species presents a high fermentation purity and produces low levels of undesirable compounds like hydrogen sulfide, volatile phenols, acetoin, acetaldehyde and diacetyl. The realization of co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* on high sugar must, allows a systematic reduction of the volatile acidity of wines, in comparison to a pure fermentation of *S. cerevisiae*. Moreover, co-inoculation with the *T. delbrueckii* strain OXT1 1 // 2 allowed the increase of aromatic complexity of a Sauvignon blanc dry wine (esters + 25%, 2-phenylethanol +51 % and volatile thiols + 31 %). At last, the development of a fermentor with double compartment allowing a physical separation of yeasts and preserving the homogeneity of culture medium, allowed us to approach the study of yeast interactions. Inhibitions of type “cell-cell contact” have been demonstrated.

Title : Phenotypic characterization of *Torulaspora delbrueckii* species in wine conditions. Application to co-inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* species.

Keywords : *Torulaspora delbrueckii*, non-*Saccharomyces*, phenotypic variability, co-inoculation, wine, interaction.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marina BELY, Maître de Conférences à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour qui m'a offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Elle m'a parfaitement encadré durant ces 3 années de thèse tout en me laissant la liberté dans l'organisation de mon travail au quotidien, et a toujours su me fournir les informations nécessaires tant d'un point de vue scientifique que relationnel. Je lui adresse également ma plus grande reconnaissance pour son soutien et sa disponibilité lors de la rédaction de cette thèse.

J'exprime ma plus profonde gratitude à Jean-François et Luc LAFFORT pour le financement de cette thèse et pour la confiance qu'ils m'accordent pour poursuivre mes recherches sur l'espèce *Torulaspora delbrueckii*.

Ce travail a été effectué au laboratoire d'Oenologie Générale dirigé par le Professeur Philippe DARRIET et faisant partie de l'UMR 1219 Œnologie, ISVV, INRA (Villenave d'Ornon, France) dirigée par le Professeur Aline LONVAUD. Je les remercie sincèrement pour m'avoir accueilli et permis de travailler dans d'excellentes conditions matérielles.

Je tiens également à remercier le personnel des sociétés LAFFORT et SARCO et en particulier Virginie MOINE, Philippe MARULLO, Chantal MANSOUR, Stéphane LAGUERCHE, Marie-Laure MURAT et Maryam EHSANI pour tous les conseils qu'ils m'ont apportés et Nathalie PRABONNAUD, Philippe LOUAZIL et Hervé KLEBANOWSKI pour les nombreuses analyses réalisées.

J'exprime ma sincère gratitude aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail en qualité de président pour le Professeur Marielle BOUIX de l'Université Agroparistech, en qualité de rapporteurs : pour le Professeur Matthias SIPICZKI de l'Université de Debrecen (Hongrie) et le Professeur Pierre STREHAIANO de l'Université de Toulouse, et en qualité d'examineur pour le Docteur Benoît COLONNA-CECCALDI du groupe PERNOD-RICARD.

Je remercie également Cécile MIOT-SERTIER de l'UMR 1219 Œnologie, Ghislaine HILBERT de l'UMR 1287 EGVF, Purification HERNANDEZ-ORTE de l'Université de Saragosse (Espagne) et Rémy GHIDOSSI et Christian POUPOT de l'équipe du laboratoire Génie des procédés et environnement, UMR 1219 Œnologie, dirigée par le Professeur Martine MIETTON-PEUCHOT pour leur collaboration lors de la réalisation de cette thèse.

Je remercie sincèrement les châteaux La Tour Blanche (Alex BARREAU, Jean-Pierre FAURE), Doisy Daëne (Professeur Denis DUBOURDIEU, Jean-Jacques DUBOURDIEU), Goudichaud et Les Vignobles Ducourt (Jérémy DUCOURT) pour m'avoir fourni du moût et permis de réaliser de nombreux essais.

Je remercie chaleureusement les stagiaires qui par leurs travaux m'ont permis de compléter mes résultats, je pense en particulier à Sophie, Emilie, Tabatha, Laura et Romain.

Enfin j'adresse mes remerciements à tout le personnel du laboratoire, et en particulier Monique PONS et Warren ALBERTIN qui m'ont aidé lors de la rédaction de cette thèse mais également à tout le personnel de l'ISVV et notamment Katharina ZOTT pour son aide précieuse.

J'exprime ma plus profonde amitié à la « Kebab Team » alias Guillaume ANTALICK, Axel MARCHAL et Sophie TEMPERE pour tous les bons moments partagés au cours de ces 3 années et pour ceux à venir. Je n'oublie pas Matthieu DUFFOURT et Telma DA SILVA pour toutes les conversations passionnantes que nous avons eues et Gregory PASQUIER et Maxime BRETTE les rois du pronostique sportif. J'exprime également toute ma sympathie pour tous les autres doctorants, post-doctorants et stagiaires pour leur complicité.

Enfin je remercie sincèrement Stéphanie KRISA, Maître de Conférences au GESVAB, pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche lors de mon stage de Master réalisé sous sa direction.

Pour finir, j'adresse un grand merci à Laure et mes parents pour m'avoir toujours soutenu que ce soit avant ou pendant cette thèse.

Sommaire

Introduction	23
Etude Bibliographique	25
I Voies métaboliques d'utilisation des sucres par <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1 La fermentation alcoolique et sa régulation	26
1.1 La glycolyse	26
1.2 La respiration.....	27
1.3 La fermentation alcoolique.....	28
1.4 Régulation de la fermentation/respiration	29
1.4.1 Effet Pasteur	29
1.4.2 Effet Crabtree	30
2 La fermentation glycéropyruvique et la formation de produits secondaires	30
2.1 La fermentation glycéropyruvique : accumulation de glycérol	30
2.2 Formation de produits secondaires à partir du pyruvate	32
2.2.1 Acide succinique	32
2.2.2 Acide acétique	33
2.2.3 Acétoïne, diacétyle et 2,3-butanediol.....	36
2.2.4 Composés à fonction cétone et acétaldéhyde.....	37
2.2.5 Acide lactique.....	37
3 Cas particulier : adaptation au stress osmotique	37
II Les levures d'intérêts oenologiques	39
1 Ecologie des levures	40
1.1 Localisation des levures	40
1.1.1 Sur la baie.....	41

1.1.2	Sur le matériel vitivinicole	41
1.2	Evolution de la population au cours de la fermentation alcoolique	42
2	Interactions entre levures au cours de la fermentation alcoolique	44
2.1	Ethanol	44
2.2	Acides gras à courte chaîne	45
2.3	Activité « killer ».....	45
2.4	Autres composés toxiques	46
2.5	Limitation nutritionnelle	47
2.6	Contact cellulaire (« cell-cell contact ») et compétition pour l'espace	47
2.7	Quorum sensing.....	49
3	Propriétés oenologiques des non- <i>Saccharomyces</i>	49
3.1	Impact potentiel au cours de la fermentation alcoolique.....	49
3.2	Propriétés aromatiques	50
3.2.1	Production d'arômes d'intérêt.....	50
3.2.2	Défauts organoleptiques.....	53
3.3	Autres propriétés œnologiques.....	54
4	Utilisation des non- <i>Saccharomyces</i> : inoculation mixte avec <i>S. cerevisiae</i>	54
III	L'espèce <i>Torulaspota delbrueckii</i>	57
1	Connaissances générales sur l'espèce <i>Torulaspota delbrueckii</i>	57
1.1	Classification / Caractéristique génétique	57
1.2	Ecologie.....	59
1.3	Résistance à différents stress.....	59
2	Connaissances œnologiques sur l'espèce <i>Torulaspota delbrueckii</i>	61
2.1	Aptitude fermentaire	61
2.2	Propriétés aromatiques	61

2.3 Capacité fructophile / Relance de fermentation	63
2.4 Résistance à l'éthanol.....	64
2.5 Membrane plasmique : besoin en oxygène	64
2.6 Facteur killer	66
2.7 Inoculation mixte et interaction entre <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i>	66
Matériels et méthodes	68
I Matériel biologique.....	68
II Milieu de fermentation	70
1 Milieu synthétique.....	70
2 Moûts.....	71
III Fermentations.....	71
1 Pré-culture	71
1.1 Au laboratoire.....	71
1.2 En chai.....	72
2 Suivi des fermentations	72
2.1 Suivi manuel : Erlenmeyer ou bouteille.....	72
2.2 Suivi automatisé : Fermenteur 1,2 L.....	73
2.3 Suivi manuel de la densité : barrique ou cuve.....	75
IV Dénombrement de la concentration cellulaire	75
1 Coulter Counter (compteur à particules).....	75
2 Estimation de la viabilité cellulaire.....	77
3 Dénombrement sur milieux gélosés	77
3.1 Milieu pour la culture des levures totales.....	77
3.2 Milieu non- <i>Saccharomyces</i>	78

V	Contrôle d'implantation	78
1	Extraction d'ADN : clone saver card	79
2	PCR	79
2.1	PCR-RFLP des régions ITS	79
2.2	PCR-inter <i>DELTA</i>	80
3	Migration sur gel et interprétation.....	81
VI	Caractérisation génétique des souches de <i>T. delbrueckii</i>	82
1	Extraction d'ADN	82
2	Conditions des PCR	82
3	REA-PFGE (Restriction Endonuclease Analysis-Pulse Field Gel Electrophoresis) ...	83
4	Analyse du profil électrophorétique et estimation de la relation génétique entre les souches	84
VII	Analyse des produits de la fermentation.....	84
1	Analyses courantes (sucres, éthanol, acidité volatile, dioxyde de soufre)	84
2	Azote assimilable (azote α -aminé + azote ammoniacal	85
3	Glycérol et glucose/fructose.....	85
4	Esters fermentaires	85
5	Thiols volatils.....	86
6	Composés volatils majeurs.....	86
7	Thiamine.....	87
VIII	Autres protocoles.....	87
1	Activité « killer ».....	87
2	Test de croissance.....	88
3	Production d'H ₂ S.....	89
4	Production de phénols volatils	89

5	Extraction glycérol interne	90
5.1	Détermination du poids sec du culot cellulaire	90
5.2	Extraction du glycérol interne	91
IX	Analyse statistique	92
	Résultats et Discussion	93
I	Identification génétique des souches de <i>T. delbrueckii</i>	93
II	Caractérisation phénotypique de l'espèce <i>T. delbrueckii</i>	96
1	Tests spécifiques	96
1.1	Activité killer.....	96
1.2	Production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S)	97
1.3	Production de phénols volatils	97
1.4	Croissance à différentes températures.....	99
2	Propriétés fermentaires.....	101
2.1	Rendement éthanol/sucres.....	101
2.2	Production d'éthanol	101
2.3	Cinétiques de fermentation.....	103
2.4	Production d'acidité volatile et de glycérol.....	105
2.5	Composés aromatiques.....	110
2.6	Consommation du glucose/fructose	113
2.7	Consommation de la thiamine.....	116
2.8	Effet de la concentration en SO ₂ et du pH du milieu sur le démarrage de la fermentation alcoolique.....	122
2.8.1	Effet SO ₂	123
2.8.2	Effet pH.....	125
2.9	Capacité biotique de l'espèce <i>T. delbrueckii</i>	126

III	Adaptation au stress osmotique.....	131
1	Evolution de la production d'AV et de glycérol au cours de la fermentation alcoolique	132
2	Etude d'un choc osmotique	141
IV	Co-inoculations <i>T. delbrueckii</i> / <i>S. cerevisiae</i>	147
1	Moût liquoreux.....	148
1.1	Effet du rapport d'inoculation	149
1.2	Effet de l'azote sur la fermentation alcoolique	156
1.3	Comparaison des souches 31703, OXT1 1//2 et de 2 souches commerciales.....	162
1.4	Essais en chai	165
2	Moûts blancs secs et rosés.....	170
2.1	Essai en laboratoire	170
2.2	Essais en chai	174
V	Développement d'un fermenteur à double compartiment.....	179
1	Objectifs et intérêts.....	181
2	Contraintes de fonctionnement initiales	183
3	Etapas de développement	183
3.1	Conception	184
3.2	Choix de la membrane interne	185
3.3	Nouveau système d'homogénéisation : pompe péristaltique	186
3.4	Choix du système de filtration : capsules de filtration	187
3.5	Pilotage de la pompe	191
3.6	Surpoids du dispositif et conséquences	192
4	Validation du fermenteur	193
4.1	Absence de contaminations entre les compartiments, stérilité du dispositif et homogénéité du milieu	194

4.2 Comparaisons fermenteur à double compartiment / fermenteur simple	196
5 Application : vérification de l'hypothèse « cell-cell contact ».....	201
5.1 Déroulement de la fermentation et cinétiques fermentaires.....	203
5.2 Populations maximales.....	207
5.3 Effet de la séparation physique des 2 espèces.....	209
Synthèse générale et Perspectives	214
Références Bibliographiques	219

Liste des Figures

Figure 1 : Voie de la glycolyse et de la fermentation alcoolique.....	27
Figure 2 : Différentes voies d'assimilation du pyruvate par la levure (Postma et <i>al.</i> , 1989b).	29
Figure 3 : Voie de la fermentation glycéro-pyruvique.....	31
Figure 4 : Cycle de Krebs et formation du succinate par voie réductive du cycle.....	33
Figure 5 : Voies de formation de l'acide acétique.....	34
Figure 6 : Formation de diacétyl, acétoïne et 2,3-butanediol.....	36
Figure 7 : Identification des levures du moût de raisin et du vin d'après K.C. Fugelsang (1997).	58
Figure 8 : Installation permettant le suivi automatisé de la fermentation alcoolique (fermenteur 1,2L).	73
Figure 9 : Paramètres cinétiques obtenus par l'installation permettant le suivi automatisé des fermentations : Vitesse (g CO ₂ /L/h) et CO ₂ dégagé (g/L) en fonction du temps (h).	74
Figure 10 : Compteur à particules Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter).	75
Figure 11 : Schéma de la cellule de mesure du Coulter Counter Z2.	76
Figure 12 : Graphique représentant le nombre de cellules/mL en fonction de leur diamètre, Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter).	76
Figure 13 : Interprétation des profils obtenus par migration sur gel d'agarose après PCR-RFLP des régions ITS de <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et de mélanges <i>T. delbrueckii</i> / <i>S. cerevisiae</i>	81
Figure 14 : Test d'activité « killer » sur milieu MB.	88
Figure 15 : Profils ADN de 21 souches de <i>T. delbrueckii</i> obtenus par REA-PFGE avec <i>Not I</i>	95
Figure 16 : Concentrations en phénols volatils pour 28 souches de <i>T. delbrueckii</i> et 2 <i>S. cerevisiae</i> (VL1 : POF- et ST : POF+).	98
Figure 17 : Augmentation de la densité optique (D.O. _{590f} / D.O. _{590i}) à 10°C, 26°C et 37°C pour 16 souches de <i>T. delbrueckii</i>	100
Figure 18 : Distribution des souches de <i>T. delbrueckii</i> en classe selon leur production d'éthanol à 17°C (n=11) et à 24°C (n=16) sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres.	102

Figure 19 : Evolution du dégagement de CO ₂ de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> (CLIB 504, CLIB 505, 31703, 27828 et Lm1T10) et 1 souche de <i>S. cerevisiae</i> (ST) à 17 et 24°C sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres.....	103
Figure 20 : Production d'acidité volatile et de glycérol sur milieux synthétiques avec 3 concentrations en sucres différentes (120, 240 et 350 g/L) à 24°C pour 13 souches de <i>T. delbrueckii</i> et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i>	108
Figure 21 : Consommation moyenne de glucose et fructose de 8 souches de <i>T. delbrueckii</i> et de 4 souches de <i>S. cerevisiae</i> à 4 et 8 % vol. éthanol et à la fin de la fermentation alcoolique. Les résultats sont exprimés en % de sucres consommés par rapport à la valeur initiale : 120 g/L de glucose et 120 g/L de fructose.....	114
Figure 22 : Rapport glucose consommé / fructose consommé à 4 et 8% vol. éthanol pour 8 souches de <i>T. delbrueckii</i> et 4 souches de <i>S. cerevisiae</i>	115
Figure 23 : Evolution de la concentration résiduelle en thiamine et de la concentration cellulaire (représentée sur échelle logarithmique décimale) en fonction du temps pour 4 souches de <i>T. delbrueckii</i> : OXT1 1//2 et OXT1 2//3: (A), OXT5 6//3 et GI1: (B) et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> : ST et SB (C).....	118
Figure 24 : Evolution du dégagement de CO ₂ à 24°C sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres pour 4 souches de <i>T. delbrueckii</i> (OXT1 1//2, OXT1 2//3, OXT5 6//3 et GI1) et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST et SB).....	119
Figure 25 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps pour les 4 souches de <i>T. delbrueckii</i> : OXT1 1//2, OXT1 2//3, OXT5 6//3 et GI1 et les 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> : ST et SB. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max de $\pm 5.10^6$	119
Figure 26 : Vitesses de consommation maximales de la thiamine pour 4 souches de <i>T. delbrueckii</i> (OXT1 1//2, OXT1 2//3, OXT5 6//3 et GI1) et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST et SB).....	120
Figure 27 : Corrélation entre concentration cellulaire maximale et vitesse de consommation maximale de la thiamine pour les 4 souches de <i>T. delbrueckii</i>	120
Figure 28 : Evolution de la concentration résiduelle en thiamine et en azote assimilable en fonction du temps pour 4 souches de <i>T. delbrueckii</i> : OXT1 1//2 et OXT1 2//3 (A), OXT5 6//3 et GI1) (B) et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> : ST et SB (C).....	121
Figure 29 : Durées des phases de latence de 10 souches de <i>T. delbrueckii</i> et de 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> sur 3 milieux synthétiques à pH 3,3 avec des concentrations en SO ₂ libre différentes de : 1 ; 2,5 et 3,6 g/hL.....	124
Figure 30 : Durées des phases de latence de 10 souches de <i>T. delbrueckii</i> et de 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> sur 3 milieux synthétiques (SO ₂ libre = 1 g/hL) ajustés à 3 pH différents : 3 ; 3,3 et 3,6.....	125

Figure 31 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps sur milieu MS de 7 souches de <i>T. delbreckii</i> (Cbm621, 31703, GI1, Lm1T20, OXT1 18/33, Lm1T10 et OXT1 1//2) et de 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST et SB). Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max de $\pm 5.10^6$.	127
Figure 32 : Exemple de graphiques obtenus lors de l'analyse des populations d'une souche de <i>T. delbrueckii</i> et d'une souche de <i>S. cerevisiae</i> par compteur à particules sur milieu MS.	128
Figure 33 : Taille moyenne des cellules de 7 souches de <i>T. delbreckii</i> (Cbm621, 31703, GI1, Lm1T20, OXT1 18/33, Lm1T10 et OXT1 1//2) et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST et SB) en fin de croissance sur milieu MS.	128
Figure 34 : Photo de la souche de <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 prise au microscope électronique à balayage en début de croissance (grossissement X 24000).	129
Figure 35 : Photo de la souche de <i>S. cerevisiae</i> ST prise au microscope électronique à balayage en début de croissance (grossissement X 24000).	129
Figure 36 : Volume cellulaire total des populations de 7 souches de <i>T. delbreckii</i> (Cbm621, 31703, GI1, Lm1T20, OXT1 18/33, Lm1T10 et OXT1 1//2) et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST et SB) en fin de croissance sur milieu MS.	130
Figure 37 : Concentrations en AV (a) et glycérol (b) en fin de phase de croissance et à 5 % vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> .	134
Figure 38 : Quantités d'AV (a) et de glycérol (b) formés par mg de matière sèche en fin de phase de croissance et à 5 % vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> .	136
Figure 39 : Vitesses de dégagement de CO ₂ en fonction du temps pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et les 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	138
Figure 40 : Production d'AV en fonction de la production de glycérol pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et de 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	139
Figure 41 : Corrélation entre la concentration finale en AV et la concentration finale en glycérol pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	140
Figure 42 : Quantités d'AV (a) et de glycérol (b) par mg de matière sèche en fonction du temps pour les cultures pures de 3 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	142
Figure 43 : Evolution de la quantité de glycérol interne par unité de volume cellulaire ($\mu\text{g}/\mu\text{m}^3 \times 10^9$) en fonction du temps pour les cultures pures de 3 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	143

Figure 44 : Evolution de la quantité de glycérol interne en fonction de la production de glycérol externe pour les cultures pures de 3 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	144
Figure 45 : Evolution de la quantité d'AV en fonction de la quantité de glycérol externe pour les cultures pures de 3 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	145
Figure 46 : Evolution de la quantité glycérol interne en fonction de la quantité d'AV pour les cultures pures de 3 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	146
Figure 47 : Evolution du dégagement de CO ₂ au cours du temps pour les 7 co-inoculations <i>T. delbrueckii</i> / <i>S. cerevisiae</i> au rapport 10/1 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST.	151
Figure 48 : Evolution du dégagement de CO ₂ au cours du temps pour les co-inoculations avec <i>T. delbrueckii</i> 31703 et Lm1T20 aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et pour la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST.	152
Figure 49 : Azote assimilable résiduel pour les 7 co-inoculations aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST.	154
Figure 50 : Acidité volatile finale pour les 7 co-inoculations aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et la culture pure <i>S. cerevisiae</i> ST.	155
Figure 51 : Concentration finale en glycérol pour les 7 co-inoculations aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et la culture pure <i>S. cerevisiae</i> ST.	156
Figure 52 : Evolution du dégagement de CO ₂ au cours du temps pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST. Milieu liquoreux ajusté à différentes concentrations en azote assimilable : 75, 120, 165, 210, 255 ou 300 mgN/L.	158
Figure 53 : Acidité volatile finale pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure <i>S. cerevisiae</i> ST. Milieu liquoreux ajusté à différentes concentrations en azote assimilable : 75, 120, 165, 210, 255 ou 300 mgN/L.	159
Figure 54 : Concentrations cellulaires maximales (X _{max}) en fonction de la concentration en azote assimilable du moût pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure <i>S. cerevisiae</i> ST.	160
Figure 55 : Concentration en glycérol pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure <i>S. cerevisiae</i> ST. Milieu liquoreux ajusté à différentes concentrations en azote assimilable : 75, 120, 165, 210, 255 ou 300 mgN/L.	161
Figure 56 : Evolution du dégagement de CO ₂ au cours du temps pour les co-inoculations et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST.	163
Figure 57 : Acidité volatile finale pour les 4 co-inoculations et la culture pure <i>S. cerevisiae</i> ST.	164

Figure 58 : Evolution de la densité au cours du temps pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST. Essai Château La Tour Blanche.	166
Figure 59 : Acidité volatile finale pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST. Essai Château La Tour Blanche.	167
Figure 60 : Acidité volatile finale pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST. Essai Château Doisy Daëne.	168
Figure 61 : Evolution du dégagement de CO ₂ au cours du temps pour les 3 co-inoculations et la culture pure <i>S. cerevisiae</i> F33.	171
Figure 62 : Evolution de la densité au cours du temps sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> X5.	175
Figure 63 : Schéma du double bioréacteur à membranes d'Albasi <i>et al.</i> (2001).	180
Figure 64 : Fermenteur à double compartiment vu de face.	184
Figure 65 : Débits obtenus lors de la filtration du milieu synthétique MS par reflux et aspiration à travers la capsule de filtration Sartobran 300 pour différentes vitesses de rotation de la pompe.	188
Figure 66 : Débits obtenus au cours du temps par reflux à travers la capsule de filtration Sartobran 300 du milieu MS pour différentes vitesses de rotation de la pompe.	189
Figure 67 : Débits obtenus au cours du temps par aspiration à travers la capsule de filtration Sartobran 300 du milieu MS pour différentes vitesses de rotation de la pompe.	189
Figure 68 : Débits et pression au cours du temps obtenus par reflux à travers la capsule de filtration Sartobran 300 du milieu MS additionné en levures pour une vitesse de rotation de la pompe de 48 rpm.	190
Figure 69 : Fermenteur à double compartiment dans sa version finale, sur installation automatisée.	193
Figure 70 : Evolution de la composition du milieu (azote assimilable, sucres résiduels, éthanol et AV) dans le compartiment gauche (avec levures) et droit (sans levures) du double fermenteur.	195
Figure 71 : Cinétiques de fermentations obtenues pour le fermenteur à double compartiment et un fermenteur simple lors de l'expérience n°4.	198
Figure 72 : Représentation logarithmique de l'évolution des concentrations cellulaires dans les compartiments droit et gauche du double fermenteur et dans le fermenteur simple lors de l'expérience n°4.	199

Figure 73 : Evolution de la composition du milieu (éthanol, AV et azote assimilable) dans les 2 compartiments du double fermenteur et dans un fermenteur simple lors de l'expérience n°4.	200
Figure 74 : Présentation des différentes modalités de l'expérience avec les concentrations en cellules viables des 2 souches <i>T. delbrueckii</i> CBS et <i>S. cerevisiae</i> S101.....	203
Figure 75 : Vitesses de dégagement de CO ₂ des 4 modalités exprimées en fonction du temps (a) et en fonction du dégagement de CO ₂ (b).....	205
Figure 76 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire de la souche <i>S. cerevisiae</i> S101 en fonction du dégagement de CO ₂ dans le double fermenteur (symbole plein) et dans le fermenteur simple sans séparation (symbole vide).....	211
Figure 77 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire de la souche <i>T. delbrueckii</i> CBS en fonction du dégagement de CO ₂ dans le double fermenteur (symbole plein) et dans le fermenteur mixte sans séparation (symbole vide).....	211

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase de <i>S. cerevisiae</i> (Navarro-Avino <i>et al.</i> , 1999).	38
Tableau 2 : Classification des genres de levures d'intérêts œnologiques selon Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> (2004) d'après la classification de Kregger-van Rij (1984).	40
Tableau 3 : Intérêts de l'utilisation des non- <i>Saccharomyces</i> en inoculation mixte avec <i>S. cerevisiae</i> .	56
Tableau 4 : Souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisées.	68
Tableau 5 : Souches de <i>Torulaspora delbrueckii</i> utilisées.	69
Tableau 6 : Présentation des conditions des différentes PCR utilisées.	83
Tableau 7 : Profils génétiques obtenus par PCR RAPD, PCR Fingerprinting et REA-PFGE.	94
Tableau 8 : Paramètres cinétiques : durée de phase de latence et T50 à 17°C et 24°C pour 16 souches de <i>T. delbrueckii</i> et 2 souches de <i>S. cerevisiae</i> sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres.	104
Tableau 9 : Production d'acidité volatile (AV) et de glycérol par les espèces <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> à 24°C dans les milieux synthétiques à 120, 240 et 350 g/L de sucres.	107
Tableau 10 : Analyse de variance (ANOVA 2 facteurs) sur l'influence de la souche de <i>T. delbrueckii</i> et de la concentration initiale en sucres du milieu sur la production d'acidité volatile et de glycérol.	109
Tableau 11 : Teneurs moyennes en composés volatils majeurs produits à 24°C par 12 souches de <i>T. delbrueckii</i> sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres.	111
Tableau 12 : Présentation des expériences ayant servies à l'évaluation de l'effet de la concentration en SO ₂ et du pH du milieu sur le démarrage de la fermentation alcoolique.	123
Tableau 13 : Concentrations moyennes en AV et glycérol en fin de phase de croissance et à 5 % vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	113
Tableau 14 : Rendements moyens AV/matière sèche et glycérol/matière sèche en fin de phase de croissance et à 5 % vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	137

Tableau 15 : Valeurs moyennes des vitesses de fermentation, de la biomasse (matière sèche) et des vitesses spécifiques (vitesse/biomasse) en phase de croissance et en fin de phase de croissance (au moment de l'obtention de la V_{max} .) pour les cultures pures de 5 souches de <i>T. delbrueckii</i> (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de <i>S. cerevisiae</i> (ST, SB et VL3).	138
Tableau 16 : Durées de phase de latence et de la fermentation pour les 7 co-inoculations <i>T. delbrueckii</i> / <i>S. cerevisiae</i> ST aux rapports 10/1 et 20/1 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> ST.	151
Tableau 17 : Concentrations en éthanol, sucres, azote résiduel et acidité volatile en fin de fermentation alcoolique sur moût Sémillon, pour les 3 co-inoculations et la culture pure <i>S. cerevisiae</i> F33.	172
Tableau 18 : Production d'arômes fermentaires sur moût Sémillon pour les 3 co-inoculations et la culture pure <i>S. cerevisiae</i> F33.	173
Tableau 19 : Concentrations en éthanol, sucres, azote résiduel et acidité volatile en fin de fermentation alcoolique sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> X5.	175
Tableau 20 : Production d'arômes fermentaires sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> X5.	176
Tableau 21 : Production en thiols volatils sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> X5.	177
Tableau 22 : Concentrations en éthanol, sucres, azote résiduel et acidité volatile en fin de fermentation alcoolique sur moût rosé de Merlot, pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> X5.	178
Tableau 23 : Production d'arômes fermentaires sur moût rosé de Merlot, pour la co-inoculation avec <i>T. delbrueckii</i> OXT1 1//2 et la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> X5.	178
Tableau 24 : Comparaison du fermenteur à double compartiment et d'un fermenteur simple : étude des paramètres cinétiques.	197
Tableau 25 : Concentrations cellulaires maximales (X_{max}) et en fin de fermentation alcoolique (X_f) obtenues dans les compartiments droit et gauche du double fermenteur et dans un fermenteur simple.	199
Tableau 26 : Ethanol et sucres résiduels en fin de fermentation alcoolique, pour les 4 modalités.	204
Tableau 27 : Paramètres cinétiques pour les 4 modalités: durée de la phase de latence, vitesse maximale de dégagement de CO_2 (V_{max} .), vitesse de dégagement à 40% de la réaction (V_{45}).	206
Tableau 28 : Populations cellulaires maximales (X_{max}) pour les 4 modalités.	208

Liste des Abréviations

Abréviations courantes

4MSP : 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one

3SH : 3-sulfanylhexan-1-ol

A3H : Acétate de 3-sulfanylhexyl

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ADP : Adénosine triphosphate

ALD : Acétaldéhyde déshydrogénase

AV : Acidité volatile

BET : Bromure d'éthydiu

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CO₂ : Dioxyde de carbone

dNTP : Désoxyribonucléotide-5-triphosphate

DO : Densité optique

EDTA : Ethylène-diamine tétra-acétate

FA : Fermentation alcoolique

FAD / FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide

FID : Détecteur à ionisation de flamme

GAP : Glycéraldéhyde-3-phosphate

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse

GPD : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase

GTP : Guanosine triphosphate

ITS : Internal transcribed spacer (espace transcrit intergénique)

IOEB : Collection de la faculté d'oenologie de l'Université de Bordeaux, France

LSA : Levure Sèche Active

NAD⁺ / NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADP⁺ / NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PCR : Polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)

PFGE : Pulsed field gel electrophoresis (Electrophorèse sur gel en champ pulsé)

POF : Phenolic Off-Flavour

PVC : Polyvinyl chloride

RAPD : Random amplified polymorphic DNA (amplification aléatoire d'ADN polymorphe)

REA : Restriction endonuclease analysis

RFLP : Restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de taille des fragments de restriction)

rpm : Rotation par minute

SO₂ : Dioxyde de soufre

TAV : Titre alcoométrique volumique

TBE : Tampon tris-acide borique-EDTA

TE : tris-HCL/EDTA

Tris : tris-hydroxyméthyl-aminoacétate

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultraviolet

UMR : Unité mixte de recherche

Unités

g, mg, µg : Gramme, milligrammes, microgrammes

h, min, s : Heures, minutes, secondes

hL, L, mL, µL : hectolitre, litre, millilitre, microlitres

M, mM, µM, nM : Molaire, millimolaire, micromolaire, nanomolaire

mm, µm, nm : millimètre, micromètre, nanomètre

mol, mmol, µmol, nmol : moles, millimoles, micromoles, nanomoles

NTU : Nephelometric Turbidity Unit

pb, kb : Paires de bases, Kilo paires de bases

Introduction

L'élaboration du vin, c'est-à-dire la transformation du jus de raisin (moût) en vin, est un processus complexe nécessitant de nombreuses étapes. La fermentation alcoolique est l'étape principale de ce processus et permet la transformation des sucres contenus dans le moût en éthanol par l'intermédiaire des levures.

La formation d'éthanol est aussi accompagnée d'une production de centaines d'autres produits issus du métabolisme secondaire des levures. Ces molécules peuvent avoir un impact positif ou négatif sur la qualité des vins. Elles sont produites en plus ou moins grande quantité selon les conditions de vinification et l'espèce de levure.

Depuis quelques années, de nombreuses études écologiques ont vu le jour et ont permis de mettre en évidence que les levures non-*Saccharomyces* pouvaient jouer un rôle important au cours de la fermentation alcoolique. En effet, elles sont majoritairement présentes sur les baies de raisin et peuvent être détectées tout au long de la fermentation alcoolique à des concentrations relativement importantes. Lors d'une fermentation spontanée, avec la flore indigène, les levures non-*Saccharomyces* prédominent le moût durant la phase pré-fermentaire ainsi qu'au début de la fermentation alcoolique, avant que les levures *S. cerevisiae* colonisent le milieu et achève la fermentation. La dominance des non-*Saccharomyces*, pendant le début de la réaction, laisse généralement des empreintes sur la composition finale du vin. De nombreux chercheurs se sont alors intéressés aux métabolismes spécifiques des différentes espèces de levures non-*Saccharomyces* et à leurs applications potentielles dans l'élaboration du vin. Malgré cela, très peu de levures non-*Saccharomyces* sont utilisées en œnologie de façon industrielle et 99% des souches utilisées appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Torulaspora delbrueckii* qui est une levure non-*Saccharomyces* ayant été décrite pour avoir un impact positif sur la qualité organoleptique des vins. En effet, cette levure produit peu de composés à défaut olfactif et notamment peu d'acide acétique, en grande partie responsable de l'acidité volatile des vins.

Dans un premier temps, nous avons évalué plusieurs méthodes de biologie moléculaire utilisées pour la caractérisation génétique des souches de diverses espèces de levures non-

Saccharomyces, afin de voir si elles pouvaient être utilisées pour différencier les souches de *T. delbrueckii*.

Puis, afin d'évaluer le potentiel œnologique de l'espèce *T. delbrueckii*, nous avons réalisé une caractérisation phénotypique de cette espèce en conditions œnologiques, à l'aide de différents tests spécifiques et de fermentations réalisées sur milieux synthétiques. Dans une troisième partie, nous avons abordé l'étude des mécanismes de réponse au stress osmotique de l'espèce *T. delbrueckii*.

Suite à la caractérisation de l'espèce *T. delbrueckii*, nous avons sélectionné les souches les plus performantes d'un point de vue œnologique, afin de réaliser des co-inoculations avec l'espèce *S. cerevisiae* sur moût liquoreux et sur moûts blancs secs et rosés.

Enfin, dans une cinquième et dernière partie, nous avons décrit les étapes du développement d'un outil indispensable pour l'étude des interactions, sous la forme d'un fermenteur à double compartiment, permettant une séparation physique de deux microorganismes. Ce fermenteur a ensuite été utilisé pour étudier le phénomène de « cell-cell contact » entre les espèces *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*.

Etude Bibliographique

Notre étude bibliographique permet, dans un premier temps, de rappeler les voies métaboliques d'utilisation des sucres conduisant à la formation d'éthanol mais également de toute une série de produits, dits, secondaires. Les mécanismes spécifiques de réponse au stress osmotiques chez l'espèce *S. cerevisiae* seront également abordés. Puis, nous nous sommes intéressés aux levures non-*Saccharomyces*, c'est-à-dire à l'évolution de leurs populations, leurs mécanismes d'interactions et à leur intérêt pour l'industrie œnologique. Enfin, après une brève présentation de l'espèce *T. delbrueckii*, nous avons détaillé toutes les connaissances œnologiques actuelles concernant cette espèce.

I Voies métaboliques d'utilisation des sucres par *Saccharomyces cerevisiae*

La principale levure réalisant la fermentation alcoolique en conditions œnologiques, en brasserie et en panification, est *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure a été particulièrement étudiée et de nombreux travaux décrivent en détail la biochimie de ses réactions. Ils nous serviront donc de base pour l'explication des voies métaboliques d'utilisation des sucres en conditions œnologiques. Les levures sont des organismes chimio-organotrophes, c'est-à-dire qu'elles tirent l'énergie qui leur est nécessaire de la dégradation des composés organiques qui sont leur véritable « carburant ». Il existe ainsi chez la levure de vinification deux processus producteurs d'énergie :

- La phosphorylation au niveau du substrat qui peut être aérobie ou anaérobie. Elle permet la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) par formation d'une liaison ester phosphorique riche en énergie, entre le carbone oxydé du substrat et une molécule de phosphate minéral qui est transférée sur l'ADP (adénosine diphosphate) par transphosphorylation pour former l'ATP. Ce processus a lieu durant la glycolyse.

- La phosphorylation oxydative qui est un processus aérobie. Elle permet la synthèse d'ATP par transport des électrons par la chaîne respiratoire des cytochromes jusqu'à l'accepteur final qui est l'oxygène.

La dégradation des sucres par les levures, en fonction des conditions d'aérobiose, peut donc se faire par 2 voies métaboliques différentes : la fermentation alcoolique et la respiration qui commencent par une étape commune appelée glycolyse.

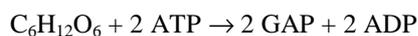
Dans cette partie, nous nous intéresserons principalement, après un bref rappel sur la glycolyse, à la fermentation alcoolique et à la production de métabolites secondaires. Un chapitre sera également consacré à la fermentation alcoolique en conditions hyperosmotiques.

1 La fermentation alcoolique et sa régulation

1.1 La glycolyse

L'assimilation des sucres commence par le transport des molécules à travers la membrane cytoplasmique vers l'intérieur de la cellule. Ils sont ensuite phosphorylés dans la cellule et assimilés par la voie métabolique appelée glycolyse qui conduit, grâce à un complexe enzymatique, à la formation de pyruvate (figure1). La description complète de la glycolyse date de 1940 grâce notamment aux travaux de Embden, Meyerhoff et Neuberger.

La glycolyse se déroule en deux parties. Dans la première, la molécule de glucose, après deux phosphorylations et une isomérisation, est scindée en deux molécules isomères de trioses phosphates: la glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et la dihydroxyacétone phosphate qui est rapidement transformée en GAP au cours de la glycolyse. Autrement dit, la molécule de glucose est transformée en 2 molécules de GAP. Cette étape induit une dépense d'énergie car 2 molécules d'ATP sont dégradées.



Dans la deuxième partie, qui conduit à la production de pyruvate, l'énergie est récupérée sous forme d'ATP avec formation de NADH.



Le bilan de la glycolyse se solde donc par une balance positive de 2 ATP et 2 NADH.

Le déroulement de cette voie métabolique dépend de la présence du NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) qui est le cofacteur de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase. Ainsi le co-enzyme réduit (NADH), formé au cours de la réaction, doit être continuellement réoxydé pour assurer le bon fonctionnement de la glycolyse. En anaérobiose, cette réoxydation s'effectue au cours de la réduction du pyruvate ou de l'un de ses multiples produits de transformation. En aérobie, la réoxydation du coenzyme réduit s'opère par un

transfert d'électrons sur l'oxygène, catalysé par des complexes enzymatiques dans les mitochondries.

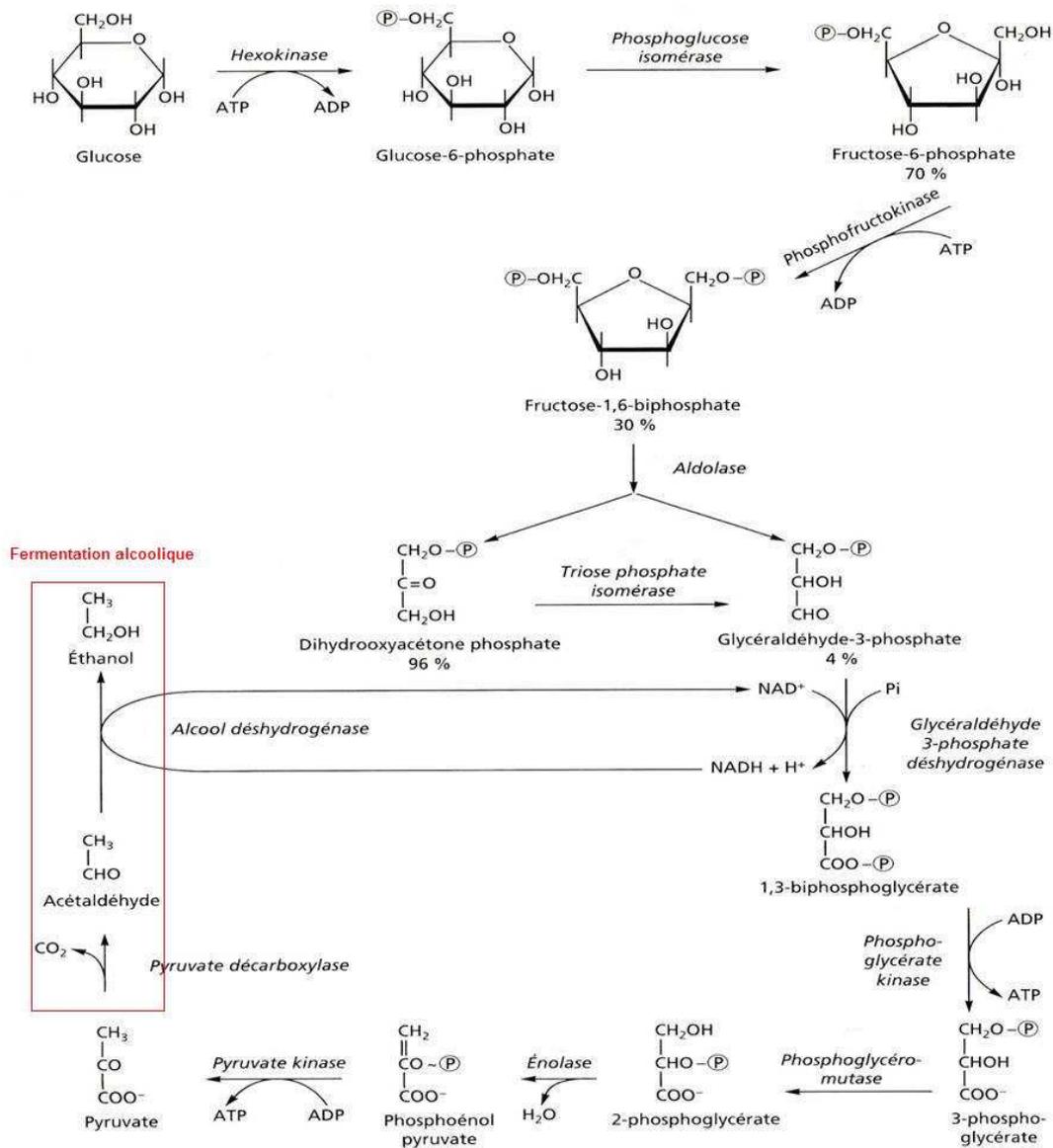


Figure 1 : Voie de la glycolyse et de la fermentation alcoolique.

1.2 La respiration

En aérobiose, le pyruvate issu de la glycolyse est complètement oxydé en CO₂ et H₂O. Cette oxydation, qui se déroule dans la matrice des mitochondries, est obtenue en trois étapes : décarboxylation oxydative du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase en présence de coenzyme A, cycle de Krebs (aussi appelé cycle de l'acide citrique ou des acides

tricarboxyliques) et chaîne respiratoire. Au cours des deux premières étapes, l'acide pyruvique, molécule à trois atomes de carbone, donne naissance à trois molécules de CO₂, cinq molécules de coenzymes réduits (4 NADH et 1 FADH₂) et une molécule de GTP (guanosine triphosphate) riche en énergie. L'oxygène, absent de toutes ces réactions, n'intervient qu'au niveau de la chaîne respiratoire où il accepte les électrons apportés par les coenzymes réduits. Cette troisième étape permet la libération d'énergie par le mécanisme des oxydations phosphorylantes.

Le bilan énergétique de la respiration d'une molécule de glucose est de 36 ou 38 molécules d'ATP : 2 proviennent de la glycolyse, 28 de la phosphorylation oxydative à partir du NADH et du FADH₂ générés lors du cycle de Krebs, 2 de la phosphorylation du substrat au niveau de la formation du succinate et 4 à 6 ATP provenant de la phosphorylation oxydative à partir des 2 molécules de NADH issues de la glycolyse.

1.3 La fermentation alcoolique

L'équation globale de la fermentation alcoolique, conduisant à la production de 2 molécules d'éthanol par molécule de glucose dégradée, a été décrite dès 1815 par Gay-Lussac :



La glycolyse génère du pouvoir réducteur sous forme de NADH qui doit être réoxydé en NAD⁺. Chez la levure, en condition anaérobie, ceci est accompli en 2 étapes à partir du pyruvate provenant de la glycolyse (figure 1). Tout d'abord, le pyruvate subit une décarboxylation par la pyruvate décarboxylase (dont le cofacteur est la thiamine pyrophosphate) pour donner l'acétaldéhyde. La seconde étape est la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol par le NADH, réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase.

D'un point de vue énergétique, la glycolyse suivie de la fermentation alcoolique fournit donc à la levure 2 molécules d'ATP par molécule de glucose dégradée, ce qui met à disposition de la levure 18 à 19 fois moins d'énergie biologiquement utilisable que la respiration.

1.4 Régulation de la fermentation/respiration

1.4.1 Effet Pasteur

Pasteur a comparé la croissance des levures en aérobiose et anaérobiose et constaté une inhibition de la fermentation par la respiration. Lorsque la levure peut utiliser les sucres indifféremment par respiration ou par fermentation (uniquement possible pour de faibles concentrations en glucose, ce qui n'est pas le cas en conditions oenologiques), l'aération induit une augmentation de la quantité de biomasse formée (totale et par unité de sucre dégradée), une diminution de la production d'alcool et de la consommation de sucres. Pasteur en déduit que la respiration inhibe la fermentation.

Une hypothèse, pouvant expliquer cet « effet Pasteur » est que la respiration inhibe la fermentation par compétition des enzymes catalysant soit la respiration, soit la fermentation du pyruvate (figure 2). Quand deux enzymes sont en compétition pour un même substrat, la constante d'affinité est un paramètre décisif pour l'orientation de son flux métabolique vers l'une des voies. La pyruvate décarboxylase, impliquée dans la voie fermentaire, présente une constante d'affinité pour le pyruvate (6 mM) supérieure à celle de la pyruvate désydrégénase (0,4 mM) (Postma *et al.*, 1989). La vitesse de réaction enzymatique étant inversement proportionnelle à la constante d'affinité, le pyruvate est préférentiellement métabolisé par respiration par la pyruvate désydrégénase.

Une autre explication est l'inhibition par l'ATP des enzymes de la glycolyse et notamment de la phosphofructokinase, ce qui entraîne une accumulation d'hexoses phosphorylés, un ralentissement du transport transmembranaire des sucres et donc de la glycolyse.

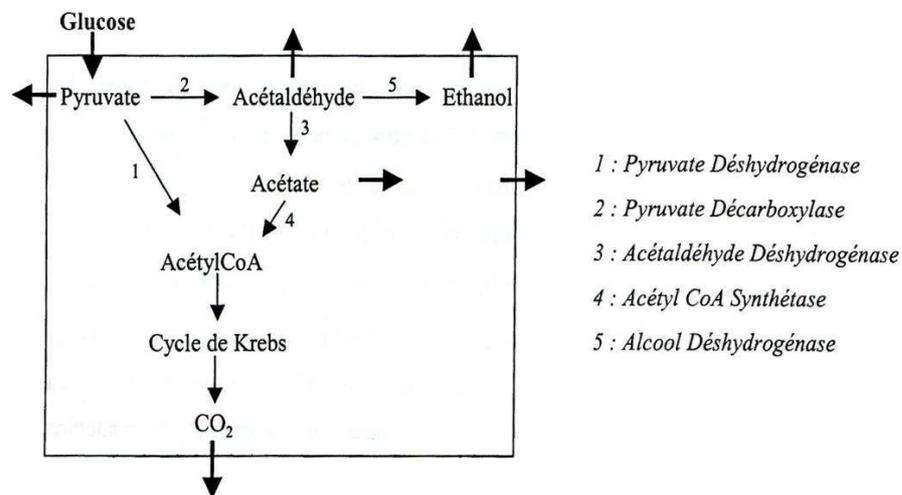


Figure 2 : Différentes voies d'assimilation du pyruvate par la levure (Postma *et al.*, 1989b).

1.4.2 Effet Crabtree

Lorsque la concentration en glucose est élevée, comme dans un moût de raisin, *S. cerevisiae* ne métabolise les sucres que par voie fermentaire. Même en présence d'oxygène, la respiration est alors impossible. Ce phénomène, découvert par Crabtree en 1929, est appelé répression catabolique par le glucose, ou encore contre-effet Pasteur ou effet Crabtree. Il se traduit chez la levure par une dégénérescence des mitochondries, une diminution du taux de stérols et d'acide gras cellulaires et une répression de la synthèse des enzymes mitochondriales du cycle de Krebs et des constituants de la chaîne respiratoire (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

Par ailleurs, selon certains auteurs, le passage du métabolisme respiratoire au métabolisme fermentaire ne serait pas dû à une répression des fonctions mitochondriales mais à la capacité respiratoire limitée des cellules, ce qui provoque une augmentation de la concentration en pyruvate et donc une dégradation ultérieure par la voie de la pyruvate décarboxylase (fermentaire) (Petrik *et al.*, 1983; Urk *et al.*, 1989). En d'autres termes, si le flux de glucose assimilé par la glycolyse ne sature pas la capacité des voies oxydatives à incorporer le pyruvate, le métabolisme de la levure est respiratoire et, si la capacité respiratoire est saturée, le glucose est transformé en éthanol par un métabolisme respiro-fermentaire.

L'effet Crabtree se manifeste chez *S. cerevisiae* à partir de 1 g/L de glucose. La répression exercée sur les levures de vinification dans les moûts de raisin est telle qu'elles sont alors contraintes de fermenter. Une levure sera dite « Crabtree positive » si on observe une répression de la respiration en cas de forte concentration de glucose dans le milieu de culture. En conséquence, de l'éthanol sera synthétisé même en présence d'oxygène. A l'opposé, les levures « Crabtree négatives » sont susceptibles de fonctionner en métabolisme oxydatif et, même à de très fortes teneurs en sucres, elles ne produisent pas d'éthanol (Fiechter et Seghezzi, 1992).

2 La fermentation glycéropyruvique et la formation de produits secondaires

2.1 La fermentation glycéropyruvique : accumulation de glycérol

Dans le vin, 92% des sucres fermentescibles sont transformés en éthanol par la fermentation alcoolique et 8% suivent la voie de la fermentation glycéropyruvique conduisant à la

production de glycérol, de pyruvate et d'autres produits secondaires dérivant de ce dernier (acide succinique, diacétyle, 2,3-butanediol, acétoïne, acide acétique...) (Ribéreau-Gayon et al., 2004).

La majorité du glycérol est produite durant la dégradation des cent premiers grammes de sucres, ensuite la production est plus lente mais toujours étroitement liée à la fermentation alcoolique. En effet, en début de fermentation, si le moût estensemencé avec des levures qui ont eu une croissance en présence d'oxygène, la pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase sont faiblement exprimées (Schmitt *et al.*, 1983; Sharma et Tauro, 1986), ce qui limite la production d'acétaldéhyde et sa réduction en éthanol. Par ailleurs, en présence de sulfite, l'acétaldéhyde se combine et ne peut être réduit en éthanol (Neuberg, 1946). Ainsi, en début de fermentation, l'acétaldéhyde nécessaire à l'oxydation du NADH fait défaut, l'accepteur final des électrons provenant de l'oxydation de la GAP est alors la dihydroxyacétone-1-phosphate qui est ensuite réduite en glycérol-3-phosphate, lui-même déphosphorylé en glycérol qui s'accumule (entre 4 à 9 g/L en condition classique de vinification) (figure 3).

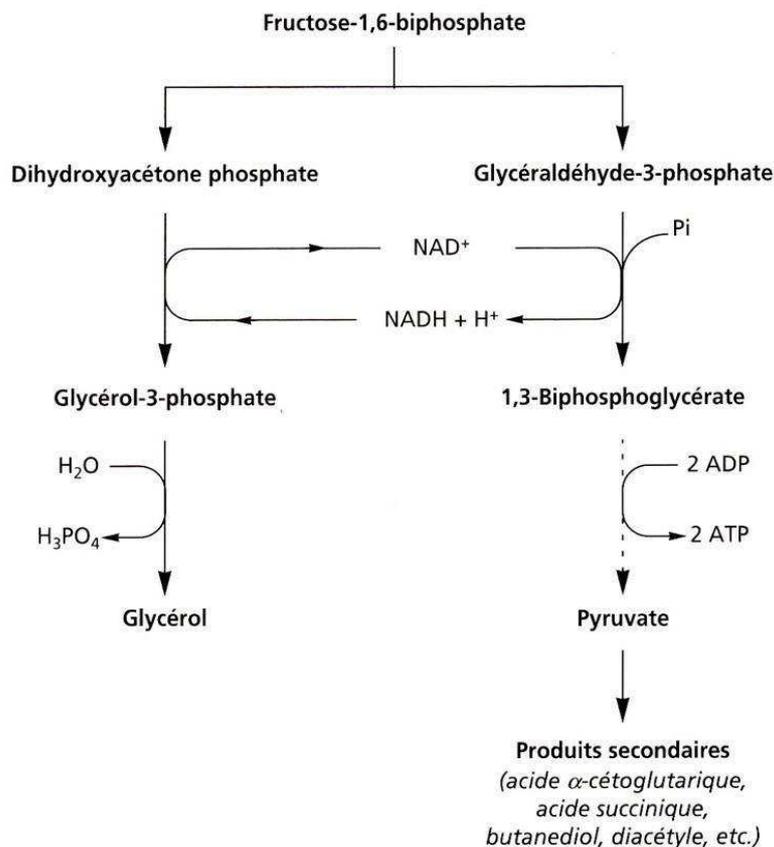


Figure 3 : Voie de la fermentation gly ro-pyruvique.

Le bilan énergétique de la fermentation glycéropyruvique est nul pour la levure car les 2 ATP formés au cours de la réaction sont nécessairement utilisés pour activer le glucose dans la première étape de la glycolyse. Cependant, la production de glycérol sert à la levure à équilibrer son potentiel d'oxydo-réduction, c'est-à-dire sa balance NAD^+/NADH . Ce système permet également à la levure d'éliminer le NADH excédentaire généré par la synthèse des acides aminés, des protéines et de certains produits secondaires et est impliqué dans les mécanismes de réponse au stress osmotique.

2.2 Formation de produits secondaires à partir du pyruvate

Chaque fois qu'une molécule de glycérol est formée, il y a également formation d'une molécule de pyruvate qui ne peut être réduite en éthanol et engendre la formation de produits secondaires.

2.2.1 Acide succinique

En anaérobiose, la voie d'entrée du pyruvate dans le cycle cytosolique de l'acide citrique est l'oxaloacétate. En effet, bien que les mitochondries ne soient plus fonctionnelles, les enzymes du cycle de Krebs sont présentes dans le cytoplasme. La carboxylation du pyruvate en oxaloacétate est catalysée par la pyruvate carboxylase et nécessite la dégradation d'une molécule d'ATP (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). Or, en anaérobiose, le cycle de Krebs ne peut être complet car l'activité de la succinate déshydrogénase nécessite la présence de FAD, coenzyme strictement respiratoire (Furukawa et Kimura, 1971). La chaîne des réactions s'interrompt donc au niveau du succinate qui s'accumule (formation de 0,5 à 1,5 g/L). Le NADH, généré par le fonctionnement de cette portion du cycle (de l'oxaloacétate au succinate), est réoxydé par la formation de glycérol à partir de la dihydroxyacétone.

Certains auteurs, considérant que l'activité ∞ -cétoglutarate déshydrogénase est très faible en anaérobiose, estiment que les réactions oxydatives du cycle de Krebs sont interrompues au niveau de l' ∞ -cétoglutarate. Ils en déduisent que l'acide succinique est formé non par voie oxydative mais par la voie réductive du cycle de Krebs en anaérobiose, comme cela existe chez les bactéries (Camarasa *et al.*, 2003) (figure 4) : oxaloacétate \rightarrow malate \rightarrow fumarate \rightarrow succinate.

Cependant cette voie est vraisemblablement minoritaire chez la levure car la balance d'oxydo-réduction NAD^+/NADH , pendant la fermentation ne peut être obtenue que par la voie oxydative « normale » du cycle de Krebs (Oura, 1977).

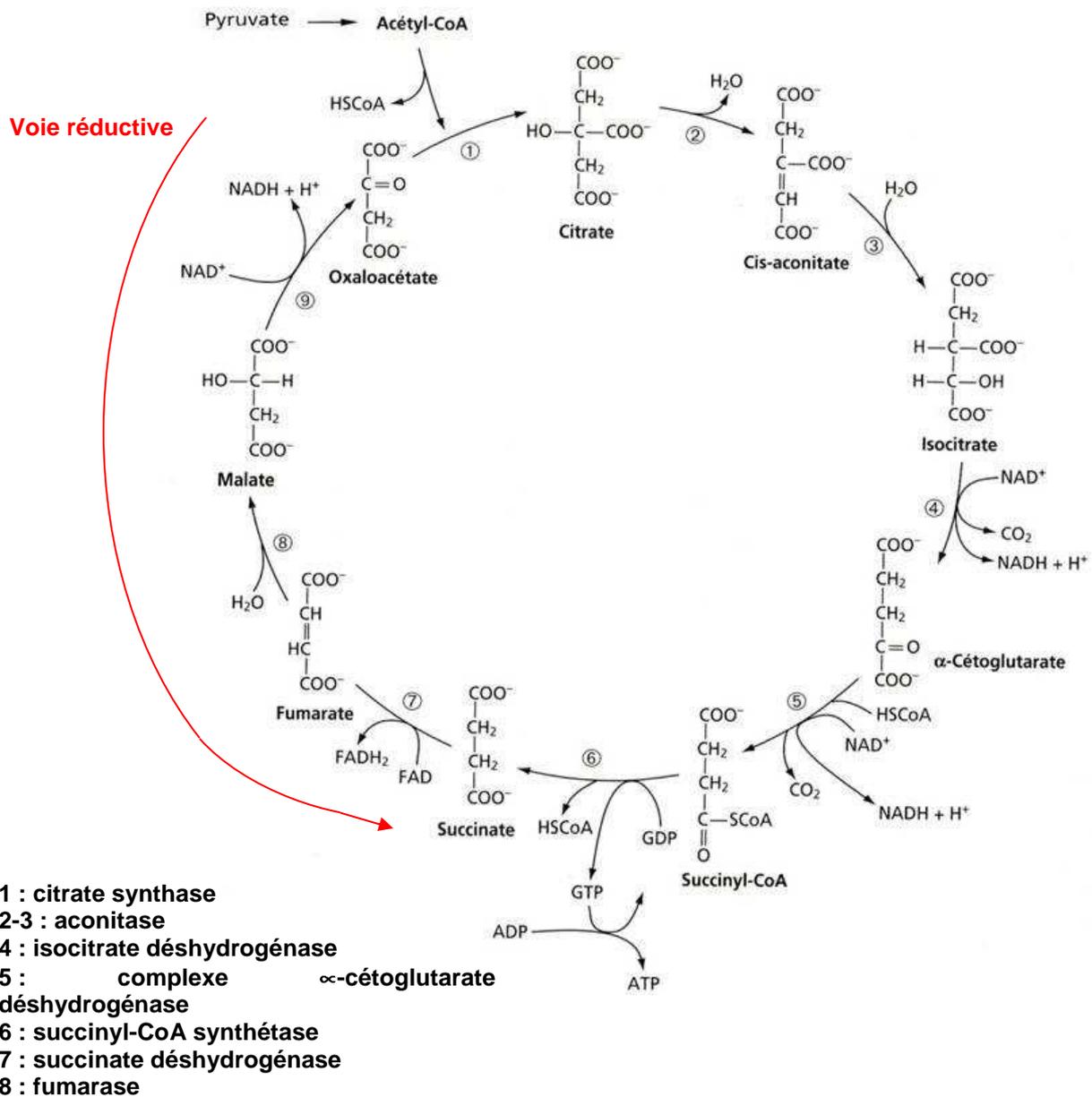


Figure 4 : Cycle de Krebs et formation du succinate par voie réductive du cycle.

2.2.2 Acide acétique

L'acide acétique est la principale substance dosée en œnologie sous le terme d'acidité volatile. En effet, l'acide acétique représente 95% de l'acidité volatile des vins, les 5% restant étant du à l'accumulation d'autres acides organiques volatils au cours de la vinification. Au-delà d'une certaine teneur, environ 0,6 g/L, l'acide acétique joue un rôle négatif sur les qualités organoleptiques des vins (Lambrechts et Pretorius, 2000). Lors de la fermentation d'un moût de raisin classique, *S. cerevisiae* en produit entre 0,1 et 0,3 g/L mais la production peut être beaucoup plus importante lors, notamment, de la fermentation des moûts liquoreux.

La production d'acide acétique n'est pas constante au cours de la fermentation, où il est principalement produit au début de la réaction à cause d'un équilibre d'oxydoréduction défavorable (Withing, 1976). En revanche, lors de la seconde partie de la fermentation, la levure pourrait consommer une partie de l'acide acétique formé et le réincorporer dans son métabolisme (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

La production d'acidité volatile est variable entre les souches d'une même espèce (Shimazu et Watanabe, 1981). Ces résultats sont confirmés par Postma *et al.* (1989) et Verduyn *et al.* (1990) qui précisent que les souches produisant le moins d'acétate étaient celles qui avaient la plus grande activité acetyl-CoA synthétase.

En effet, l'acide acétique semble être produit, en anaérobiose, par l'oxydation de l'acétaldéhyde par l'aldéhyde déshydrogénase (ou acétaldéhyde déshydrogénase) (figure 5) qui est active pendant la fermentation et qui a pour cofacteur le NADP⁺ (nicotinamide dinucléotide phosphate sous forme oxydée). Le NADPH formé peut alors être utilisé pour les synthèses lipidiques. Cette voie sert à former de l'acétyl-CoA, grâce à l'acétyl-CoA synthétase lorsque le complexe de la pyruvate déshydrogénase est réprimé (Llorente et de Castro, 1977). *A contrario*, si les quantités d'acétyl-CoA formées sont supérieures aux besoins de la levure, une part importante d'acide acétique est alors produite (Remize *et al.*, 2000).

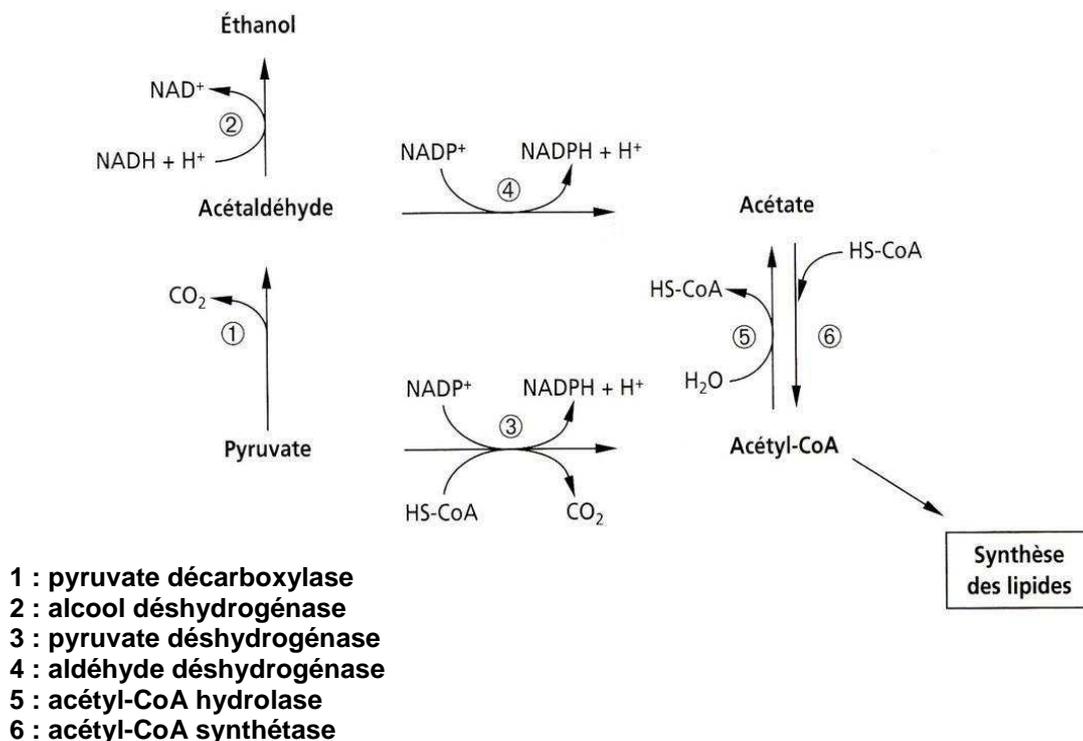


Figure 5 : Voies de formation de l'acide acétique.

Une autre hypothèse serait que la production d'acide acétique soit issue de l'hydrolyse de l'acétyl-CoA, issu de la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique par le complexe de la pyruvate déshydrogénase. Or, cette réaction se déroule dans la matrice des mitochondries et elle est donc sûrement limitée en anaérobiose.

La quantité d'acide acétique produite par une levure au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin est fortement influencée par l'espèce et la souche de levure responsable de la fermentation et par la teneur initiale du moût en sucres. En effet, plus celle-ci est élevée plus la production d'acide acétique est grande, indépendamment de la quantité de sucres fermentés (Lafon-Lafourcade, 1979). Le phénomène est accentué pour les moûts botrytisés (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1979). En effet, *Botrytis cinerea* libère une substance appelée « botryticine » qui conduit à une déviation du métabolisme levurien vers la fermentation glycéro-pyruvique et donc une augmentation de la production d'acide acétique (et de glycérol) et à une excrétion de cet acide en fin de fermentation par les levures en phase de déclin (Lucmaret, 1980).

La formation d'acidité volatile dépend également de la composition du milieu et des conditions physico-chimiques. Elle augmente fortement en anaérobiose, aux pH inférieurs à 3 et supérieurs à 3,4, pour des températures comprises entre 20 et 25°C, et lorsque le milieu est carencé en acide pantothénique (Lafon, 1955). Certaines carences en acides aminés et en vitamines entraînent des déviations du métabolisme levurien qui s'accompagne d'une production relativement importante d'acidité volatile (Lafon Lafourcade et Ribéreau-Gayon 1977).

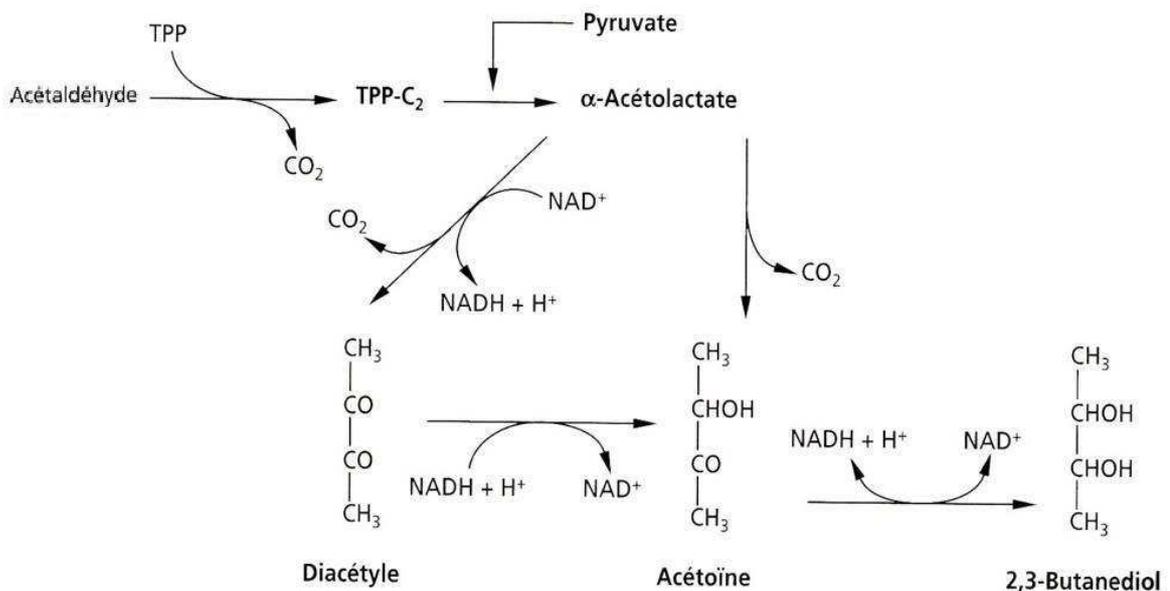
Un débourbage sévère contribue également à l'augmentation de la production d'acidité volatile (Delfini et Cervetti 1987). Par contre, l'addition d'ergostérol (25 mg/L) diminue la formation d'acide acétique par *S. cerevisiae*. L'ajout supplémentaire d'acide oléique ou de Tween 80 (Delfini *et al.*, 1989) accentue ce phénomène. Le rôle de la fraction lipidique des bourbes sur la maîtrise de la production d'acidité volatile a également été mis en évidence par Lavigne (1996).

Enfin, l'acide acétique à des concentrations élevées est fortement inhibiteur des levures (Schanderl, 1959). A faibles pH, il pénètre massivement dans la cellule causant une acidification intracellulaire qui déclenche une protéolyse (Lampen, 1966).

2.2.3 Acétoïne, diacétyl et 2,3-butanediol

Ces 3 composés sont formés par la levure à partir de l'acide pyruvique par condensation avec une molécule d'acétaldéhyde actif combiné au pyrophosphate de thiamine et qui forme l'acide α -acétolactique (figure 6). Le diacétyl provient de la décarboxylation oxydative de l'acide α -acétolactique. L'acétoïne résulte soit de la décarboxylation non oxydative de l'acide α -acétolactique soit de la réduction du diacétyl. Ces composés sont produits en très faible quantité par les levures (quelques mg/L).

Le diacétyl (note beurrée) est une molécule qui a faibles concentrations (< 4 mg/L) améliore la qualité du vin mais qui, à des concentrations plus élevées, a un impact négatif (Rankine *et al.*, 1969). Par ailleurs, la majorité du diacétyl formé au cours de la fermentation alcoolique est réduite en acétoïne (crèmeux, lacté) et 2,3-butanediol qui sont des composés beaucoup moins odorants (Postel et Meier, 1983, de Revel *et al.*, 1989).



TPP : pyrophosphate de thiamine ; TPP-C₂ : acétaldéhyde actif

Figure 6 : Formation de diacétyl, acétoïne et 2,3-butanediol.

2.2.4 Composés à fonction cétone et acétaldéhyde

Les composés à fonction cétone (acide pyruvique, acides α -cétoniques) et l'acétaldéhyde sont toujours présents dans le vin et sont les principaux responsables de la combinaison du dioxyde de soufre. La synthèse maximale d'acétaldéhyde a lieu en général durant la phase de prolifération des levures. Elle est augmentée par la température et un excès d'aération (McCloskey et Mahaney, 1981) mais surtout par la présence de SO₂ libre dans le moût (Barbe *et al.*, 2000). En effet, la production d'acétaldéhyde sulfureux est un moyen de protection de la levure contre le SO₂. La production des acides cétoniques augmente avec des pH et des températures élevés, des conditions d'anaérobiose et des carences en thiamine et en acide pantothénique (Lafon-Lafourcade et Peynaud, 1965).

2.2.5 Acide lactique

L'acide lactique est également un produit secondaire issu de la réduction du pyruvate par les lactico-déshydrogénases de la levure. Cette enzyme existe sous deux formes L(+) et D(-) mais, lors de la fermentation alcoolique, la principale forme active est la D(-) conduisant à la formation de 200 à 300 mg/L d'acide D(-) lactique contre seulement quelques dizaines de milligrammes d'acide L(+) lactique.

3 Cas particulier : adaptation au stress osmotique

L'adaptation du métabolisme de la levure au stress osmotique est un mécanisme complexe entraînant la régulation d'un grand nombre de gènes. Ainsi, une étude réalisée par Erasmus *et al.* (2003), comparant la fermentation, par une même souche de *S. cerevisiae*, d'un moût à 200 g/L de sucres à celle du même moût supplémenté pour obtenir une forte concentration (400 g/L), a permis de mettre en évidence que 589 gènes, sur les 4592 testés, ont eu une expression modifiée (au minimum d'un facteur deux). Trois cent quarante six gènes ont vu leur expression augmenter, tandis que 243 gènes l'ont vu diminuer. D'une manière générale, le stress osmotique induit l'augmentation de la régulation des enzymes de la glycolyse et des enzymes permettant la formation de glycérol, tréhalose, glycogène mais aussi d'acide acétique et succinique. Les gènes impliqués dans la synthèse *de novo* de purines, pyrimidines, histidine et lysine voient leur régulation diminuer. Enfin, toujours selon ces auteurs, le taux de croissance maximale ainsi que la population maximale sont très inférieurs lors de la fermentation du moût à forte concentration en sucres (Erasmus *et al.*, 2003).

Nous allons nous intéresser principalement dans ce chapitre, à l'augmentation de la production de glycérol et d'acide acétique, qui jouent un rôle important pour la cellule et pour la qualité du vin.

Comme nous l'avons décrit précédemment, en anaérobiose, l'acide acétique est principalement formé à partir de l'acétaldéhyde par l'intermédiaire de l'acétaldéhyde déshydrogénase qui est présent sous cinq isoformes différents chez *S. cerevisiae*. Trois isoformes sont cytosoliques et codés par les gènes : *ALD2*, *ALD3* et *ALD6* et deux sont mitochondriaux : *ALD4* et *ALD5* (Navarro-Aviño *et al.*, 1999). Ces enzymes diffèrent par leur spécificité d'utilisation des cofacteurs : NAD^+ pour celles codées par les gènes *ALD2* et *ALD3* et NADP^+ pour celles codées par *ALD5* et *ALD6*. L'isoforme codée par *ALD4* peut utiliser les deux cofacteurs (tableau 1).

Tableau 1 : Isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase de *S. cerevisiae* (Navarro-Avino *et al.*, 1999).

Gène	Localisation	Cofacteur
<i>ALD2</i>	Cytoplasme	NAD^+
<i>ALD3</i>	Cytoplasme	NAD^+
<i>ALD4</i>	Mitochondrie	NAD^+ et NADP^+
<i>ALD5</i>	Mitochondrie	NADP^+
<i>ALD6</i>	Cytoplasme	NADP^+

La délétion successive des cinq gènes codant pour ces isoformes montre que l'isoforme cytoplasmique *ALD6* NADP -dépendant est le principal responsable de la production d'acide acétique au cours de la fermentation des vins secs (sans stress osmotique important). L'isoforme mitochondrial *ALD5* NADP dépendant est également impliqué, mais dans une moindre mesure (Blondin *et al.*, 2002, Remize *et al.*, 2000).

Dans les moûts très riches en sucres, c'est-à-dire supérieurs à 300 g/L de sucres (cas des moûts liquoreux), les levures doivent adapter leur métabolisme pour résister à ce stress osmotique important. Or, nous avons vu précédemment que les productions de glycérol et d'acide acétique sont dépendantes de la concentration initiale en sucres du moût, et que plus celle-ci est élevée, plus la production de ces deux composés augmente.

En effet, *S. cerevisiae* augmente son accumulation de glycérol intracellulaire pour contrebalancer la pression osmotique du milieu et ainsi éviter la sortie d'eau de la cellule vers le milieu extérieur (Blomberg, 2000; Blomberg et Adler, 1992; Erasmus *et al.*, 2004; Erasmus *et al.*, 2003; Hohmann, 2002). Cette régulation est contrôlée par une cascade de transmission

de signal qui aboutit à l'augmentation du niveau de transcription des gènes impliqués dans la formation de glycérol et d'acide acétique. Ainsi l'isoforme de la glycérol-3-phosphate déhydrogénase NADH-dépendante, codée par le gène *GPD1*, est surexprimée pour augmenter la production de glycérol tandis que la production d'acide acétique est accrue par la surexpression des isoformes de l'acétaldéhyde déhydrogénase NAD⁺ dépendants: *ALD2* et *ALD3* (Attfield et Kletsas, 2000; Navarro-Aviño *et al.*, 1999; Pigeau et Inglis, 2005) qui ont alors une activité supérieure à *ALD6* en condition de stress osmotique. Cependant, selon les travaux d'Erasmus *et al.* (2003) sur la réponse au stress osmotique de *S. cerevisiae* sur moût de raisin, c'est l'isoforme de l'acétaldéhyde déshydrogénase codée par le gène *ALD4* NAD⁺ ou NADP⁺ dépendant qui est principalement augmentée en conditions hyperosmotiques (multiplié par 15,5) alors que l'activité des gènes *ALD2*, *ALD3* et *ALD6* est respectivement augmentée par 2,6, 5,9 et 3,7.

En conditions hyperosmotiques, l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase semble être principalement due aux isoformes NAD⁺ dépendant. Dans ces mêmes conditions, l'augmentation de la production de glycérol par la glycérol-3-phosphate déhydrogénase NADH-dépendante (*GPD1*) génère un surplus de NAD oxydé. La production d'acide acétique permet donc à la levure d'équilibrer son potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire en régénérant des équivalents réduits de NADH (Michnick *et al.*, 1997; Remize *et al.*, 1999). Inversement, le niveau de production d'acétate peut être réduit en fournissant plus de NADH dans le processus d'équilibre d'oxydo-réduction (Bely *et al.*, 2003). Ceci peut être obtenu indirectement en stimulant la formation de biomasse (par ajout d'azote en début de réaction) qui génère un surplus de NADH au cours de la synthèse des acides aminés. Ainsi, dans les moûts riches en sucres, la production d'acétate est inversement corrélée à la population cellulaire maximale, elle-même reliée à la teneur en azote assimilable du moût.

II Les levures d'intérêts oenologiques

Les levures sont décrites comme étant des champignons unicellulaires (eucaryote) taxonomiquement hétérogènes.

De nombreuses classifications ont eu lieu depuis la classification d'Hansen au début du XX^e siècle, basée alors essentiellement sur des différences morphologiques. Depuis, des classifications incorporant des caractéristiques phénotypiques puis génétiques, grâce aux progrès réalisés en biologie moléculaire, ont vu le jour. Ainsi, selon les deux classifications actuellement en vigueur : Kregger-van Rij (1984) s'appuyant sur des tests phénotypiques, et

Barnett *et al.* (2000) basée sur les tests de réassociation ADN-ADN et l'hybridation entre souches, les levures sont rattachées aux Ascomycètes, Basidiomycètes et aux Deutéromycètes (Champignons imparfaits) et sont réparties en 81 genres comprenant 590 espèces.

Seule une petite partie de ces levures sont retrouvées dans le vin ou sur le raisin. Elles sont réparties dans 12 genres rattachés aux levures sporogènes Ascomycètes (11 dans la famille des *Saccharomycetaceae* et 1 dans la famille des *Spermophthoraceae*) et 4 genres rattachés aux levures asporogènes Deutéromycètes dans la famille des *Cryptococcaceae* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004) (tableau 2).

Tableau 2 : Classification des genres de levures d'intérêts œnologiques selon Ribéreau-Gayon *et al.* (2004) d'après la classification de Kregger-van Rij (1984).

Famille	<i>Saccharomycetaceae</i> (sporogène)			<i>Spermophthoraceae</i> (sporogène)	<i>Cryptococcaceae</i> (asporogène)
Sous-famille	<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Nadsonioideae</i>	<i>Saccharomycetoideae</i>		
Genre	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>Hanseniaspora</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> <i>Torulaspota</i>	<i>Metschnikowia</i>	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Kloeckera</i> <i>Rhodotorula</i>

La levure majoritairement responsable de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques appartient au genre *Saccharomyces*. Il est devenu courant, depuis quelques années, de regrouper les levures « œnologiques » n'appartenant pas à ce genre sous le terme de « non-*Saccharomyces* ».

1 Ecologie des levures

1.1 Localisation des levures

Les levures sont très répandues dans la nature. On les retrouve notamment dans les sols et à la surface des végétaux. Les levures sont irrégulièrement réparties à la surface de la vigne : peu nombreuses sur les feuilles, les rafles et les raisins verts, elles colonisent la pellicule des baies en maturation. Ainsi selon Fleet (2003), les baies sont les principales sources de levures non-

saccharomyces dans les moûts. Cependant, la microflore des grappes de raisin varie selon leurs variétés et leurs origines ; la température et autres influences climatiques ; le sol, la fertilité, l'irrigation et les pratiques viticoles ; les dommages physiques sur les grappes dus aux moisissures, oiseaux et insectes et aux fongicides et autres traitements phytosanitaires utilisés par les vignerons.

1.1.1 Sur la baie

Toujours selon Fleet (2003), peu de levures sont présentes sur les baies de raisin immatures soit environ 10 à 10^3 UFC/g. Les espèces principalement retrouvées sur les baies non mûres font essentiellement partie des genres *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Candida*. Il est important de noter que ces levures font partie des rares à être également retrouvées sur les feuilles de vigne (Davenport, 1974).

Au cours de la maturation du raisin, on peut observer un changement de la population levurienne qui conduit d'une part à l'augmentation du nombre de levures totales mais également à l'apparition de nouveaux genres et espèces (Barnett *et al.*, 2000). A maturité, la population de levures peut ainsi atteindre entre 10^4 et 10^6 UFC/g (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Renouf, 2006; Rosini *et al.*, 1982) et même dépasser les 10^6 UFC/g dans le cas de baies endommagées (Mortimer et Polsinelli, 1999). Les principales levures que l'on peut retrouver à maturité font partie des genres *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Zygosaccharomyces* et *Saccharomyces* (Barata *et al.*, 2008; Fleet, 2003; Martini *et al.*, 1996; Nisiotou *et al.*, 2007; Renouf *et al.*, 2006). D'autres espèces de levures peuvent cependant être présentes avec des fréquences moins importantes, c'est le cas de l'espèce *Torulasporea delbrueckii* récemment identifiée à la surface des baies de raisin (Martins et Masneuf-Pommarède, communication personnelle). Contrairement à une idée très répandue dans le domaine œnologique, *Saccharomyces cerevisiae* apparaît dans de très faibles proportions sur les grappes de raisin saines et est rarement isolée de la surface de grain intact. Mortimer et Polsinelli (1999) estiment qu'environ un grain de raisin sur mille est porteur de cette levure mais que cette fréquence peut augmenter sur des baies endommagées.

1.1.2 Sur le matériel vitivinicole

La présence de micro-organismes et notamment de levures sur la surface du matériel vitivinicole, conduisant à leur propagation dans le moût, a été confirmée par de nombreux

travaux (Frezier et Dubourdieu, 1992; Pretorius, 2000). Il en est de même pour la surface des sols et des murs des chais où les levures suivantes ont déjà été isolées : *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida sorbosa*, *Candida zeylanoides*, *Dekkera anomala*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000; Sabate *et al.*, 2002; Sangorrin *et al.*, 2007). *Saccharomyces cerevisiae* est souvent retrouvée dans la population résidente des chais. En effet, une étude a démontré qu'entre 30 et 60% des populations levuriennes après la fermentation alcoolique étaient déjà présentes dans le chai avant la rentrée du raisin (Mercado *et al.*, 2007). Ceci peut s'expliquer par le fait, sans parler du levurage réalisé par les viticulteurs, que *S. cerevisiae* est l'espèce majoritaire en fin de fermentation et est donc quantitativement plus présente que les autres espèces. Cette idée est renforcée par les travaux réalisés dans un chai par Garijo *et al.* (2008) qui ont mis en évidence que la population de levures dans l'air est limitée avant la fermentation et augmente au cours de la fermentation qui est dominée par l'espèce *S. cerevisiae*.

Les conditions hygiéniques des chais apparaissent donc d'une importance capitale pour la maîtrise des populations de levures exogènes et donc pour la conduite de la fermentation par le viticulteur.

1.2 Evolution de la population au cours de la fermentation alcoolique

Le moût de raisin représente un environnement complet en nutriments mais un nombre restreint d'espèces microbiennes peut s'y développer du fait des nombreuses contraintes qu'il génère. Son faible pH et sa teneur élevée en sucres exercent une sélection naturelle sur les micro-organismes, de sorte que peu de levures et bactéries peuvent se développer. Les concentrations en dioxyde de soufre, composé ajouté comme antioxydant et antiseptique, imposent une sélection supplémentaire. En effet, le SO₂ inhibe la croissance de nombreuses souches de non-*Saccharomyces* qui sont pour la plupart peu résistantes (Henick *et al.*, 1998; Romano et Suzzi, 1992). Cette sélectivité est encore accrue par l'établissement de conditions anaérobies : certains nutriments s'épuisent et l'augmentation de la teneur en éthanol commence à éliminer les espèces peu tolérantes et favoriser *S. cerevisiae* (Heard et Fleet, 1985, 1986). La température de fermentation joue également un rôle important. En effet, une température élevée (30°C) induit une baisse de la diversité des non-*Saccharomyces*, contrairement aux températures plus froides qui permettent une meilleure résistance à

l'éthanol des non-*Saccharomyces* et donc le développement d'un plus grand nombre d'espèces (Erten, 2002; Gao et Fleet, 1988; Mills *et al.*, 2002). L'inoculation de souches de *S. cerevisiae* commerciales joue également un rôle important dans l'inhibition des souches sauvages, même si sa propre implantation n'est pas garantie (Reed et Nagodawithana, 1988). La fermentation des jus de raisins peut donc être considérée comme un procédé microbien hétérogène mettant en œuvre un développement séquentiel de diverses espèces de levures, chacune affectée par les conditions physico-chimiques du moût et par le protocole de vinification.

Ainsi, au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin, de nombreuses espèces microbiennes se développent successivement. Durant les premières heures de fermentation, de nombreux travaux, réalisés dans des zones géographiques différentes, s'accordent à dire que les levures prédominantes dans le moût font partie des espèces *Hanseniaspora spp.*, *Kloeckera apiculata* (forme imparfaite de *Hanseniaspora uvarum*), *Pichia spp.*, *Candida spp.*, et *Metschnikowia spp* (Fleet, 2003; Pretorius, 2000). Par ailleurs, on peut trouver en nombre moins important bien d'autres espèces telles que *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces spp.*, *Zygosaccharomyces bailli*, *Debaryomyces spp*, *Rhodotorula spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Issatchenka spp.*, *Saccharomyces spp.*, etc...(Baleiras Couto *et al.*, 2005; Di Maro *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 1999; Fleet *et al.*, 1984; Ganga et Martinez, 2004; Gonzalez *et al.*, 2007; Hierro *et al.*, 2006b; Mills *et al.*, 2002; Nisiotou et Nychas, 2007; Zott *et al.*, 2008). Il est également intéressant de noter que plusieurs souches d'une même espèce peuvent se développer en même temps (Pretorius, 2000).

Ces espèces non-*Saccharomyces* initialisent la fermentation et se multiplient jusqu'à 10^6 - 10^7 UFC/mL jusqu'à la moitié de la fermentation alcoolique avant de décliner (Zott *et al.*, 2008). *S. cerevisiae* devient alors l'espèce dominante, même si des concentrations résiduelles non négligeables de l'ordre de 10^5 - 10^6 UFC/mL de levures non-*Saccharomyces* ont déjà été mises en évidence en fin de fermentation (Baleiras Couto *et al.*, 2005; Di Maro *et al.*, 2007; Hierro *et al.*, 2006a).

Le déclin des non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique était souvent associé à leur faible résistance à l'éthanol. Des travaux récents montrent qu'il existe en fait de nombreux mécanismes d'interaction entre levures qui peuvent agir de façon synergique et moduler le développement des différentes populations au cours de la fermentation alcoolique.

2 Interactions entre levures au cours de la fermentation alcoolique

Le moût de raisin est un écosystème contenant de nombreux types de micro-organismes engendrant de nombreuses interactions : levures/levures, levures/champignons filamenteux ou encore levures/bactéries. Il y a de nombreux types d'interactions définis par les termes de : commensalisme, synergisme, antagonisme, parasitisme...mais en œnologie l'interaction est souvent considérée comme l'inhibition ou l'augmentation de la croissance d'une population par une autre (Fleet, 2003). Les interactions peuvent être directes, par un contact physique ou par la libération de molécules, ou indirectes, à travers des changements physicochimiques de l'environnement provoqués par une souche pour en faire réagir une autre. L'effet de ces interactions peut être positif, négatif ou neutre (Siewewerts *et al.*, 2008).

Nous nous intéresserons dans ce chapitre uniquement aux interactions entre levures au cours de la fermentation alcoolique.

2.1 Ethanol

La production d'alcool par *S. cerevisiae* est considérée comme le principal facteur influençant la croissance des non-*Saccharomyces* durant la fermentation. En effet, l'éthanol agit en modifiant les systèmes de transport actif à travers la membrane de la cellule, ce qui ralentit l'assimilation de l'azote et paralyse la levure (Henschke et Jiranek, 1992). Il inhibe ainsi la croissance cellulaire et ralentit la vitesse de fermentation. En général, les espèces du genre *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschikowia* et *Issatchenkia* ne sont pas tolérantes à l'éthanol dès que sa concentration atteint 5-7% vol. ce qui entraîne leur déclin (Erten, 2002; Gao et Fleet, 1988; Heard et Fleet, 1988). Cependant, certaines espèces de non-*Saccharomyces*, sont résistantes à des concentrations supérieures : *Torulaspora delbrueckii*, *Candida stellata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii* (Ciani et Ferraro, 1998; Santos *et al.*, 2008). La résistance à l'éthanol peut varier d'une souche à l'autre pour une même espèce que ce soit pour *S. cerevisiae* ou d'autres espèces non-*Saccharomyces* (Bauer et Pretorius, 2000 ; Bisson et Block, 2002 ; Fleet, 1992), et peut être augmentée par des températures de fermentation basses (Erten, 2002; Gao et Fleet, 1988) et par la présence de composés membranaires comme les acides gras insaturés et les stérols (Pina *et al.*, 2004).

2.2 Acides gras à courte chaîne

Les acides gras à courte et moyenne chaîne, comme les acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque sont produits pendant la fermentation et deviennent, à certaines concentrations, inhibiteurs pour la croissance de *S. cerevisiae* et probablement des autres espèces (Bisson, 1999; Edwards *et al.*, 1990; Viegas *et al.*, 1989). En effet, ces acides gras agissent sur la perméabilité membranaire et empêchent les échanges entre la cellule et le milieu, notamment par inhibition du transport des sucres (Salmon *et al.*, 1993). La production de ces acides varie selon l'espèce et la souche (Lambrechts et Pretorius, 2000; Lema *et al.*, 1996) et peut influencer la croissance des levures.

Certains acides gras à longue chaîne en C18 (acide oléique avec une double liaison et acide linoléique avec deux doubles liaisons) sont, quant à eux, considérés comme des activateurs de la fermentation (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

2.3 Activité « killer »

Chez *S. cerevisiae*, plusieurs types de toxines killer sont connus : K1, K2, K3 et K28 (Young, 1987). Le groupe d'activité K2 est de très loin le plus largement répandu chez les souches de *S. cerevisiae* rencontrées dans le vin. La toxine K2 est une glycoprotéine de 16 kDa, active entre pH 2,8 et 4,8 avec un maximum d'activité entre 4,2 et 4,4, celle-ci est donc active au pH du moût et du vin. La toxine K2 agit sur les cellules sensibles par liaison à un récepteur pariétal, puis translocation sur un récepteur membranaire, entraînant une interruption du transport couplé des acides aminés et des protons, l'acidification du contenu cellulaire et des fuites de potassium et d'ATP par formation de pores dans la membrane plasmique. Ces altérations fonctionnelles entraînent la mort cellulaire en deux ou trois heures après le contact avec la toxine (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

Les levures dites killer sécrètent dans le milieu ces toxines protéiques capables de tuer les souches dites sensibles. Par ailleurs, les souches ne produisant pas de toxine mais, étant résistantes à celles-ci, sont dites neutres. La majorité des travaux sur le caractère killer des levures concernent *S. cerevisiae* (Gutierrez *et al.*, 2001; Musmanno *et al.*, 1999; Shimizu, 1993; van Vuuren et Jacobs, 1992). Cependant, on peut trouver des études dans lesquelles des levures non-*Saccharomyces* présentent un caractère killer, y compris envers des levures appartenant à des genres différents, comme *S. cerevisiae*. C'est le cas, par exemple, de

l'espèce *Hansenula anomala*, capable d'inhiber *S. cerevisiae* (Rosini, 1985), ou encore de *Pichia anomala*, *Kluyveromyces wickerhamii*, *Hanseniaspora uvarum* et *Candida spp* (Comitini *et al.*, 2004; Fleet et Heard, 1993; Zagorc *et al.*, 2001).

Bien que l'expression du phénotype killer ou sensible d'une souche est dépendant de nombreuses conditions physico-chimiques et du processus de vinification, il semblerait que les interactions de type killer peuvent moduler l'évolution des différentes souches et espèces au cours de la fermentation (Fleet, 2003). Cependant, son véritable rôle est sujet à controverse car, d'une part, seules les cellules en phase de croissance sont sensibles à la toxine et, d'autre part, la toxine K2 est détruite à température élevée, inactivée en présence de composés phénoliques et facilement adsorbée par la bentonite (Barre, 1992). De plus, il a été rapporté que l'implantation d'une souche sélectionnée de *S. cerevisiae* possédant l'activité killer n'est pas garantie et que certaines souches commerciales, sensibles ou neutres, s'implantent facilement même en présence de levures killer dans le moût. Il est néanmoins recommander de prendre ce facteur en compte pour la sélection des levures (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

2.4 Autres composés toxiques

Outre l'éthanol, les toxines killer et les acides gras à courte chaîne, de nombreux composés sont produits par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût comme des enzymes, des protéines, des glycoprotéines, de l'acide acétique et de l'acétaldéhyde. Si individuellement ces composés ont des pouvoirs inhibiteurs plus ou moins forts pour les levures, leurs combinaisons et leurs actions synergiques pourraient jouer un rôle important dans les mécanismes d'inhibition (Bisson, 1999; Edwards *et al.*, 1990; Fleet, 2003; Ludovico *et al.*, 2001. Perez-Nevaldo *et al.* (2006) ont étudié la croissance d'*Hanseniaspora guilliermondii* et *Hanseniaspora uvarum* en culture mixte avec *S. cerevisiae*. Leurs travaux montrent que les non-*Saccharomyces* meurent précocement si elles sont en contact avec des levures *S. cerevisiae* vivantes. Ce phénomène de mort précoce est également retrouvé pour des cellules d'*Hanseniaspora guilliermondii* cultivées dans des surnageants provenant de cultures mixtes *S. cerevisiae* / *H. guilliermondii*. Cette équipe exclut le facteur éthanol et l'inhibition par toxines killer de type K1, K2 et K28 pour expliquer la mort précoce des non-*Saccharomyces* et propose une autre hypothèse, à savoir la présence de molécules toxiques sans préciser leur nature.

2.5 Limitation nutritionnelle

La limitation nutritionnelle, c'est-à-dire la diminution de la disponibilité des nutriments, est un facteur qui module l'écologie des levures au cours de la fermentation. En effet, le développement des premières levures dans le moût diminue ses sources de nutriments et le rend moins favorable pour la croissance des autres levures.

Par exemple, les non-*Saccharomyces* semblent moins tolérantes à l'affaiblissement du taux d'oxygène disponible que *S. cerevisiae*. La disparition de l'oxygène résiduel du moût, provoqué par la croissance importante de *S. cerevisiae*, pourrait ainsi contribuer à la mort précoce des levures non-*Saccharomyces* (Hansen *et al.*, 2001). Les besoins de *S. cerevisiae* en oxygène ont été établis aux alentours de 5 à 10 mg/L. En effet, l'oxygène favorise la formation des stérols et des acides gras non saturés (appelés facteurs de survie) qui sont des composés indispensables à la stabilité des parois des levures et donc importants pour le bon déroulement de la fermentation alcoolique. Les non-*Saccharomyces* qui se développent durant les premières étapes de la fermentation, utilisent les acides aminés et les vitamines du moût et peuvent ainsi diminuer la croissance des *S. cerevisiae*. Ceci a déjà été observé dans certains travaux sur jus de raisin, où le développement de *Kloeckera apiculata* a entraîné une diminution importante de thiamine et autres micronutriments, conduisant à une faible croissance de *S. cerevisiae* (Bisson, 1999; Mortimer, 2000). Par ailleurs, la croissance des levures peut, au contraire, être augmentée par l'activité protéolytique et pectolytique de certaines espèces qui hydrolysent les protéines et pectines du moût, pouvant alors servir de substrat pour la croissance levurienne (Charoenchai *et al.*, 1997; Dizy et Bisson, 2000). La mort précoce, suivie de l'autolyse des non-*Saccharomyces*, est également une source de nutriments pour la croissance levurienne : protéines, acides nucléiques et acides aminés.

2.6 Contact cellulaire (« cell-cell contact ») et compétition pour l'espace

L'interaction de type « cell-cell contact » est surtout décrite comme ayant un impact sur le développement des cellules mais son rôle dans la capacité de provoquer la mort cellulaire d'une population est peu discutée.

Des travaux concernant des co-inoculations entre *S. cerevisiae*, d'une part, et les espèces *Kluyveromyces thermotolerans* et *Torulaspora delbrueckii*, d'autre part, ont été réalisés il y a quelques années par une équipe de chercheurs danois. Malgré des taux de croissance

similaires, les auteurs ont constaté un arrêt de fermentation plus précoce et une concentration cellulaire maximale plus faible pour les deux espèces non-*Saccharomyces* en culture mixte par rapport à leur culture pure. Une autre étude réalisée par la même équipe de chercheurs, avec les mêmes souches, a permis de mettre en évidence la mort précoce, après 48 heures, des deux non-*Saccharomyces* dans leur culture mixte respective avec *S. cerevisiae*. Cette dernière ne présente aucun déclin de sa population sur une durée de 10 jours. Les auteurs, n'ayant constaté aucune inhibition des deux non-*Saccharomyces* lors de leur développement en culture pure dans divers milieux pré-fermentés par cultures mixtes, excluent une limitation en nutriments ou la présence de composés inhibiteurs comme l'éthanol pour expliquer ce phénomène. Par ailleurs, ils ont constaté qu'il y avait inhibition de *Kluyveromyces thermotolerans* et *Torulaspora delbrueckii* seulement lorsqu'elles étaient en présence de fortes populations viables de *S. cerevisiae*, et que le fait d'isoler physiquement la souche de *S. cerevisiae* dans un boudin de dialyse ne permettait pas l'inhibition des deux non-*Saccharomyces*. Ils ont ainsi proposé, pour la première fois, qu'un mécanisme du type « cell-cell contact » puisse être à l'origine de l'inhibition de levures non-*Saccharomyces* par *S. cerevisiae* dans des conditions œnologiques (Nissen et Arneborg, 2003; Nissen *et al.*, 2003). Ils ont, par ailleurs, formulé une autre hypothèse pouvant être la cause de la mort précoce de ces 2 non-*Saccharomyces* qui serait une inhibition par compétition pour l'espace avec *S. cerevisiae*.

La même équipe de chercheurs a également étudié le comportement d'*Hanseniaspora uvarum* en culture mixte avec *S. cerevisiae*. Selon eux, le confinement imposé par les cellules viables de *S. cerevisiae* sur les cellules d'*Hanseniaspora uvarum* limite la croissance de ces dernières (temps de génération supérieur de 15% pour les cellules confinées par rapport aux cellules non confinées). L'espace de culture disponible pour un microorganisme est alors considéré comme un paramètre de compétition entre différentes espèces dans un écosystème donné. Ces travaux montrent que la limitation d'espace disponible joue un rôle sur la croissance des levures (Arneborg *et al.*, 2005).

Par ailleurs, une autre étude a montré que, durant une fermentation réalisée en co-inoculation, la biomasse de *S. cerevisiae* et de *Kloeckera apiculata* était inférieure à leur biomasse respective en culture pure. Cependant, la présence de *S. cerevisiae* lors de la fermentation mixte a permis d'augmenter la persistance de la levure non-*Saccharomyces* (Mendoza *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été trouvés par Bely *et al.* (2008) lors d'une co-inoculation *Torulaspora delbrueckii* / *S. cerevisiae* avec une population maximale de *S. cerevisiae* plus

faible et une persistance de *Torulaspora delbrueckii* accrue pour la modalité mixte, par rapport à leurs fermentations en cultures pures respectives.

2.7 Quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme par lequel les cellules microbiennes peuvent communiquer entre elles et ainsi réguler la croissance des populations. Bisson (1999) suggère donc que ce phénomène doit être pris en considération pour étudier les interactions entre micro-organismes au cours de l'élaboration du vin. Cependant, même s'il a été établi chez les levures que certaines molécules comme le bicarbonate (stimulateur de la méiose et de la sporulation) (Hayashi *et al.*, 1998; Ohkuni *et al.*, 1998), l'acétaldéhyde (synchronisateur du métabolisme levurien) (Richard *et al.*, 1996) et le cation ammonium (coordinateur de croissance) (Palkova *et al.*, 1997) peuvent intervenir dans la communication entre levures, des études complémentaires doivent être réalisées pour connaître leurs potentiels d'action au cours de la fermentation alcoolique.

3 Propriétés oenologiques des non-*Saccharomyces*

3.1 Impact potentiel au cours de la fermentation alcoolique

Dans les années 1960, les levures non-*Saccharomyces* étaient essentiellement considérées comme des levures d'altération car elles étaient souvent isolées sur des moûts ayant subi un arrêt de fermentation ou encore sur des vins avec des profils sensoriels anormaux (Castelli, 1954). Depuis les vingt dernières années, grâce notamment aux progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire, de nombreuses études écologiques ont été réalisées et ont permis de reconsidérer le véritable rôle des non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique. Comme nous l'avons vu précédemment, les levures non-*Saccharomyces* sont les levures majoritaires des baies de raisin et peuvent être détectées tout au long de la fermentation alcoolique (Egli *et al.*, 1998; Fleet, 2003; Fleet *et al.*, 1984; Heard et Fleet, 1985; Pardo *et al.*, 1989; Pina *et al.*, 2004; Zott *et al.*, 2008). Lors d'une fermentation spontanée avec la flore indigène, ces levures non-*Saccharomyces* prédominent dans le moût durant la phase pré-fermentaire ainsi qu'au début de la fermentation alcoolique, avant que la levure *S. cerevisiae* ne se développe et achève la fermentation. La dominance des non-*Saccharomyces* pendant le début de la fermentation alcoolique laisse généralement des empreintes sur la composition finale du vin d'autant plus que certains travaux ont mis en

évidence la présence résiduelle de 10^5 - 10^6 UFC/mL de levures non-*Saccharomyces* en fin de fermentation (Baleiras Couto *et al.*, 2005; Di Maro *et al.*, 2007; Hierro *et al.*, 2006b). De plus, des études ont révélé que les souches de *S. cerevisiae* utilisées comme starter ne sont pas toujours capables de prendre le dessus sur la population indigène qui domine la fermentation. Son impact sur la composition finale du vin est alors très important (Constantí *et al.*, 1998; Egli *et al.*, 1998; Ganga et Martinez, 2004; Gutierrez *et al.*, 2001; Querol *et al.*, 1992; Santamaria *et al.*, 2005; Schütz et Gafner, 1994). De nombreuses études ont ainsi été réalisées pour déterminer l'impact de ces levures sur la composition aromatique et les propriétés sensorielles des vins (Ciani *et al.*, 2010; Domizio *et al.*, 2007; Renouf *et al.*, 2007; Swiegers *et al.*, 2005).

3.2 Propriétés aromatiques

De nombreux scientifiques se sont intéressés aux propriétés aromatiques des levures non-*Saccharomyces* et à leurs impacts sur la qualité organoleptique des vins (Cabrera *et al.*, 1988; Ciani *et al.*, 2010; Ciani et Ferraro, 1998; Ciani et Maccarelli, 1998; Ciani et Picciotti, 1995; Domizio *et al.*, 2007; Egli *et al.*, 1998; Fleet, 2003, 2008; Herraiz *et al.*, 1990; Lema *et al.*, 1996; Renouf *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2003b; Romano *et al.*, 1992; Romano *et al.*, 1993; Swiegers *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2008; Zohre et Erten, 2002). De nombreuses études ont ainsi mis en évidence le rôle positif des levures non-*Saccharomyces* dans la composition des vins comme par exemple l'augmentation de la complexité aromatique (Cabrera *et al.*, 1988; Herraiz *et al.*, 1990; Lema *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1991; Viana *et al.*, 2008).

3.2.1 Production d'arômes d'intérêt

En effet, les levures non-*Saccharomyces* peuvent moduler la composition aromatique du vin de plusieurs façons :

- Métabolisme des composés du moût ;
- Hydrolyse enzymatique ;
- Autolyse et bioadsorption.

Le métabolisme secondaire des levures non-*Saccharomyces* entraînent la formation d'une centaine de composés comme : des alcools supérieurs, des esters, des acides organiques, des

aldéhydes, des cétones, des amines ou des composés soufrés volatiles (Lambrechts et Pretorius, 2000; Nykanen, 1986; Swiegers *et al.*, 2005). La production de ces composés varie en fonction des souches et espèces de levures utilisées.

Plusieurs espèces non-*Saccharomyces* ont ainsi été décrites pour leur forte aptitude à produire des esters (Rojas *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2003) qui sont des composés aromatiques jouant un rôle organoleptique important dans le vin car principalement responsables de la note fruitée (Rapp et Mandery, 1986). Par exemple, les espèces appartenant aux genres *Hanseniaspora* et *Pichia* peuvent estérifier plusieurs alcools comme l'éthanol, le géraniol, l'alcool isoamylique et le 2-phényl-éthanol (Rojas *et al.*, 2001), ce qui entraîne une production totale d'esters supérieure à celle de *Saccharomyces cerevisiae* (Viana *et al.*, 2008). Des souches d'*Hanseniaspora guillermondii*, *Hanseniaspora osmophilia* et *Pichia membranaefaciens* ont été décrites pour leurs fortes productions d'acétate de 2-phényléthyle et d'acétate d'isoamyle (Moreira *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2008). Cependant, la production importante d'esters par ces levures est souvent associée à une forte production d'acétate d'éthyle indésirable en trop forte concentration (> 150-200 mg/L) pour la qualité des vins. En effet, selon Plata *et al.* (2003) les levures qui produisent le plus d'acétate d'isoamyle : *Kloeckera apiculata*, *Hansenula subpelliculosa* et *Kluyveromyces marxianus* sont les levures qui produisent également le plus d'acétate d'éthyle. Dans les mêmes conditions *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia membranaefaciens* et *Candida guillermondii* sont caractérisées par une faible production de ces deux esters.

Les alcools supérieurs sont également des composés qui contribuent positivement à la complexité aromatique des vins jusqu'à une teneur de 300 mg/L (Rapp et Mandery, 1986). La production des différentes espèces de non-*Saccharomyces* est généralement faible pour ces composés. Certains auteurs (Gil *et al.*, 1996; Herraiz *et al.*, 1990; Moreira *et al.*, 2008; Viana *et al.*, 2008) ont ainsi mis en évidence une faible production de propanol, d'alcool isobutylique, de butanol, d'alcool isoamylique, d'hexanol et d'alcool phényléthylique par les espèces suivantes : *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata* et *Torulaspora delbrueckii*.

La production d'acides gras volatils (acide octanoïque, décanoïque, caproïque, caprylique et caprique) par les levures non-*Saccharomyces*, et en particulier les espèces suivantes : *Zygosaccharomyces bailii*, *Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces spp*, et *Torulaspora delbrueckii*, est généralement plus faible que celle de *S. cerevisiae* (Herraiz *et al.*, 1990 ; Ravaglia et Delfini, 1993).

Les levures peuvent également influencer le profil aromatique des vins par leurs activités enzymatiques qui peuvent générer la libération d'arômes variétaux à partir de composés inodores du moût (précurseurs d'arômes). Cependant, la connaissance de la diversité et de la complexité de ces réactions n'est pas encore clairement établie (Hernandez-Orte *et al.*, 2008; Swiegers *et al.*, 2005).

Parmi ces réactions, la libération des terpènes est la plus étudiée. Les monoterpènes d'alcool comme le citronellol, le géraniol, le linalol et le nérol, sont naturellement présents dans les moûts de Muscat, Riesling et autres variétés blanches, leur conférant des arômes fruités, épicés et végétaux. Cependant, une grande proportion de ces composés est liée au glucose et forme des composés inodores. Les glycosidases (comme la β -glucosidase) produites par les levures permettent de couper cette liaison et de relâcher les terpènes volatils qui ont un impact sur les caractéristiques du vin. Cette production varie selon les espèces et les souches mais certaines espèces comme *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora spp.*, *Debaryomyces spp.* et *Brettanomyces spp.* peuvent produire plus de glycosidases que *S. cerevisiae* et jouent donc un rôle important dans la libération des terpènes volatils (Fia *et al.*, 2005; Gonzalez-Pombo *et al.*, 2008; King et Richard Dickinson, 2000; Maicas et Mateo, 2005; Mendes Ferreira *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2004; Rosi *et al.*, 1994; Swiegers *et al.*, 2005; Vasserot *et al.*, 1989; Villena *et al.*, 2007).

Des études sur la production de poly-galacturonase et de β -D-xylosidase par différentes souches de non-*Saccharomyces* montrent que ces activités enzymatiques peuvent être utilisées pour augmenter la qualité des vins (Fernandez *et al.*, 2000; Manzanares *et al.*, 1999; Strauss *et al.*, 2001). Par ailleurs, les levures peuvent encore produire d'autres enzymes comme des estérases, des décarboxylases, des sulphites réductases, des protéases et des pectinases qui pourraient agir sur la composition aromatiques du vin (Charoenchai *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 2000; Strauss *et al.*, 2001). Des études complémentaires semblent néanmoins indispensables pour appréhender leurs véritables rôles.

La libération des thiols volatils (4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one, 3-sulfanylhéxan-1-ol, acétate de 3-sulfanylhéxyl) par les levures non-*Saccharomyces* a été très peu étudiée. Elle implique une activité cystéine lyase chez *S. cerevisiae*.

Enfin, bien que de nombreux travaux soient encore nécessaires, il semblerait que les levures non-*Saccharomyces*, qui composent une partie de la biomasse levurienne en fin de fermentation, soient impliquées dans la modulation aromatique du vin par autolyse et bioadsorption, au même titre que *S. cerevisiae*.

3.2.2 Défauts organoleptiques

Par ailleurs, plusieurs non-*Saccharomyces* peuvent être à l'origine de défauts olfactifs pendant les différentes étapes de la vinification : de la fermentation alcoolique à l'élevage des vins, et être ainsi considérées comme levures d'altération. Les arômes à défaut olfactif produits peuvent être par exemple une grosse production d'acide acétique, d'acétate d'éthyle, d'acétaldéhyde, d'acétoïne, de phénols volatils ou encore de sulfure d'hydrogène (Du Toit et Pretorius, 2000 ; Fleet, 1992). *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* et *Saccharomyces ludwigii* ont été décrites pour leurs fortes productions d'acétate d'éthyle, d'acide acétique et d'acétoïne au cours de la fermentation alcoolique (Ciani et Maccarelli, 1998; Ciani et Picciotti, 1995; Herraiz *et al.*, 1990; Plata *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2003a). Lors du stockage et vieillissement des vins, la présence d'oxygène dans les barriques ou les cuves peut favoriser un développement rapide en surface de levures oxydatives (ou faiblement fermentatives) appartenant généralement au genre *Candida* ou *Pichia*. Ces espèces oxydent l'éthanol, le glycérol et les acides et forment de grandes quantités d'acétaldéhyde et d'acide acétique (Fleet, 2003). Le vin en bouteille peut également être colonisé par des espèces fermentaires comme *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* (*Dekkera*), *Saccharomyces* et *Saccharomycodes*. Ces espèces peuvent provoquer l'apparition de sédiments ou de gaz mais aussi d'esters et d'acides provoquant un défaut olfactif (Sponholz, 1993). Les espèces du genre *Brettanomyces* (*Dekkera*) sont associées à la production de composés à défaut olfactif : les phénols volatils. Ils sont formés à partir des acides phénoliques contenus dans le vin. Ainsi, une première enzyme, la cinnamate décarboxylase, permet la transformation de l'acide para-coumarique en 4-vinyl-phénol (gouache, caoutchouc brûlé) et de l'acide férulique en 4-vinyl-gaïacol (clou de girofle, amande grillée). Ces deux composés sont cependant peu odorants. Les composés les plus désagréables sont le 4-éthyl-phénol (cuir, écurie, encre) et le 4-éthyl-gaïacol (épice, caramel brûlé). Ils sont formés respectivement à partir du 4-vinyl-phénol et du 4-vinyl-gaïacol, par l'intermédiaire d'une enzyme que l'on retrouve principalement chez les espèces du genre *Brettanomyces* (*Dekkera*) : la vinyl-phénol réductase (Chatonnet *et al.*, 1992; Chatonnet *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2007). D'autres espèces sont cependant capables de produire des éthyls phénols : *Candida cantarelli*, *Candida wickerhamii*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* et *Pichia guilliermondii* (Dias *et al.*, 2003). De plus, l'autolyse des levures, après la fermentation alcoolique, peut être une source significative de micronutriments pour la croissance des

levures d'altération (Charpentier et Feuillat, 1993) et spécialement pour celles appartenant au genre *Brettanomyces* (Guilloux-Benatier *et al.*, 2001).

3.3 Autres propriétés œnologiques

Certaines levures non-*Saccharomyces* ont été décrites non pas pour leur production d'arômes spécifiques mais pour d'autres propriétés toutes aussi intéressantes pour la qualité des vins. Par exemple, *Torulaspora delbrueckii* a été décrite pour la « pureté » de sa fermentation caractérisée par une très faible production d'acide acétique, d'acétoïne, de diacétyl et d'acétate d'éthyle (Ciani et Ferraro, 1998; Ciani et Picciotti, 1995). *Candida stellata* produit quant à elle des teneurs élevées en glycérol (Jolly *et al.*, 2003) supérieures au seuil du goût sucré (5,2 g/L pour les vins secs) (Noble et Bursick, 1984). *Schizosaccharomyces pombe* a été décrite pour sa capacité à réduire l'acide malique (Ciani, 1995 ; Munyon et Nagel, 1977 ; Peynaud et Sudraud, 1962 ; Rankine, 1966) et *Kluyveromyces thermotolerans* pour sa capacité à acidifier les vins (Mora *et al.*, 1990). *Hanseniaspora uvarum* et *Hanseniaspora guilliermondii* ont quant à elles été décrites pour leurs propriétés fructophiliques (Ciani et Faticenti, 1999) tout comme *Candida stellata* et *Zygosaccharomyces bailii* (Ciani *et al.*, 2000; Sousa-Dias *et al.*, 1996).

4 Utilisation des non-*Saccharomyces* : inoculation mixte avec *S. cerevisiae*

Comme nous l'avons vu précédemment, les levures non-*Saccharomyces* jouent un rôle important au cours des fermentations spontanées en apportant de la diversité et de la complexité aromatique. Cependant, les fermentations spontanées sont difficilement contrôlables d'un point de vue microbiologique et peuvent conduire à l'arrêt de fermentation ou au développement de levures d'altération. D'un autre côté, la suppression totale, ou du moins l'inhibition, des souches non-*Saccharomyces* indigènes par ajout de doses importantes de SO₂ et levurage avec une souche commerciale de *S. cerevisiae*, peut réduire la complexité aromatique finale des vins.

L'emploi de levures non-*Saccharomyces* pour orienter le profil aromatique des vins a donc été envisagé. Cependant, l'étude des différentes espèces de levures non-*Saccharomyces* a engendré un grand nombre de travaux qui s'accordent à dire que, même s'il y a des caractères aromatiques ou technologiques spécifiques pour une espèce donnée, il peut également y avoir des variations importantes entre les souches d'une même espèce. Il est donc nécessaire de

faire un « screening » pour sélectionner les souches présentant des attributs positifs (production importante d'esters, faible production d'acide acétique...) et rejeter celles avec des attributs négatifs (production importante de sulfure d'hydrogène, phénols volatils, acide acétique...). En partant de ce principe, les espèces appartenant aux genre *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* peuvent contribuer à améliorer la qualité des vins et complexifier son bouquet aromatique (Ciani et Maccarelli, 1998; Jolly *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2003a).

Cependant, ces levures, intéressantes de part leurs propriétés spécifiques, ont un point commun : des aptitudes fermentaires limitées (Ciani et Maccarelli, 1998; Ciani et Picciotti, 1995; Jolly *et al.*, 2003; Plata *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2008). Leur utilisation en culture pure engendre donc dans la majorité des cas des arrêts de fermentation. La réalisation d'inoculations mixtes entre une souche de levure non-*Saccharomyces* sélectionnée et une souche de levures *S. cerevisiae* sélectionnée apparaît donc comme la solution idéale pour, d'une part, moduler les propriétés aromatiques du vin par action de la souche non-*Saccharomyces* et, d'autre part, « sécuriser » la fermentation par action de la souche *S. cerevisiae* qui achève la fermentation alcoolique. Deux techniques sont proposées pour réaliser ces inoculations mixtes : la co-inoculation, où les deux types de levures sont inoculés en même temps, et l'inoculation séquentielle où la souche de levure non-*Saccharomyces* est inoculée en général quelques jours avant la souche *S. cerevisiae*. L'utilisation d'inoculation mixte nécessite la mise en place d'un critère de sélection supplémentaire afin de s'assurer que les deux types de levures utilisées ne présentent pas d'interaction négative qui pourrait engendrer l'inhibition de la croissance d'une levure par l'autre.

De nombreux auteurs ont travaillé sur les inoculations mixtes non-*Saccharomyces* / *S. cerevisiae* avec diverses espèces de non-*Saccharomyces* décrites pour leurs propriétés aromatiques ou technologiques lors de la fermentation alcoolique du vin. Le tableau 3 présente une liste non exhaustive des différents travaux relatant ce type de fermentation. Par exemple, *Torulaspota delbrueckii* a été utilisée en co-inoculation avec *S. cerevisiae* pour réduire l'acidité volatile des vins liquoreux (Bely *et al.*, 2008) et augmenter la qualité organoleptique des vins (Herraiz *et al.*, 1990), *Schizosaccharomyces pombe* pour dégrader l'acide malique du moût (Snow et Gallander, 1979), *Kluyveromyces thermotolerans* pour acidifier les vins (Kapsopoulou *et al.*, 2007), *Candida stellata* pour augmenter la production de glycérol (Ciani et Ferraro, 1998), *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) et *Pichia* spp pour complexifier l'arôme des vins (Clemente-Jimenez *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2008), *Pichia kluyveri* pour augmenter la teneur en thiols volatils (Anfang *et al.*, 2009)...etc.

Tableau 3 : Intérêts de l'utilisation des non-*Saccharomyces* en inoculation mixte avec *S. cerevisiae*.

Espèce utilisée en association avec <i>S. cerevisiae</i>	But	Références
<i>Candida cantarellii</i>	Augmentation teneur en glycérol	Toro et Vazquez (2002)
<i>Candida pulcherrima</i>	Modulation aromatique	Jolly <i>et al.</i> (2003); Zohre et Erten (2002)
<i>Candida stellata</i>	Augmentation teneur en glycérol	Ciani et Ferraro (1995, 1998); Ferraro <i>et al.</i> (2000)
	Modulation aromatique	Soden <i>et al.</i> (2000)
<i>Debaryomyces vanriji</i>	Augmentation teneur en géraniol	Garcia <i>et al.</i> (2002)
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Modulation aromatique	Zironi <i>et al.</i> (1993)
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>)	Modulation aromatique	Ciani <i>et al.</i> (2006); Herraiz <i>et al.</i> (1990); Mendoza <i>et al.</i> (2007); Moreira (2005); Moreira <i>et al.</i> (2008); Zironi <i>et al.</i> (1993); Zohre et Erten (2002)
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Réduction teneur en acide malique	Kim <i>et al.</i> (2008)
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	Réduction production acide acétique	Ciani <i>et al.</i> (2006); Mora <i>et al.</i> (1990)
	Augmentation acidité totale	Kapsopoulou <i>et al.</i> (2007)
<i>Pichia fermentans</i>	Modulation aromatique	Clemente-Jimenez <i>et al.</i> (2005)
<i>Pichia kluyveri</i>	Augmentation teneur en thiols volatils	Anfang <i>et al.</i> (2009)
<i>Pichia anomala</i>	Modulation aromatique	Kurita <i>et al.</i> (2008)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Dégradation acide malique	Ciani (1995); Magyar et Panic (1989); Snow et Gallender (1979); Yokotsuka <i>et al.</i> (1993)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Réduction production acide acétique	Bely <i>et al.</i> (2008); Ciani <i>et al.</i> (2006); Lafon-Lafourcade (1981); Salmon <i>et al.</i> (2007)
	Modulation aromatique	Herraiz <i>et al.</i> (1990)

III L'espèce *Torulaspora delbrueckii*

1 Connaissances générales sur l'espèce *Torulaspora delbrueckii*

1.1 Classification / Caractéristique génétique

Le genre *Torulaspora* a été défini par Lindner (1895) peu après le début des travaux de Hansen sur la taxonomie des levures au 19^{ème} siècle. Ce genre a ensuite été incorporé, ainsi que le genre *Zygosaccharomyces* dans le genre *Saccharomyces* par Lodder et Kregger-van Rij (1952), puis a été redéfini par van der Walt et Johannsen (1975). L'histoire du genre *Torulaspora* est donc intimement mêlé aux genres *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* dont il est très proche (Barnett, 1992 ; Yarrow 1984).

Aujourd'hui, selon les deux classifications actuellement en vigueur : Kregger-Van Rij (1984) et Barnett *et al.*, (2000), le genre *Torulaspora* fait partie de la sous-famille des *Saccharomycetoideae*, faisant elle-même partie de la famille des *Saccharomycetaceae* rattachée aux levures sporogènes Ascomycètes (tableau 2). Par ailleurs, le genre *Torulaspora* est composé de 6 espèces : *T. delbrueckii*, *T. globosa*, *T. franciscae*, *T. microellipsoides*, *T. pretoriensis* et *T. maleeae* (Kurtzman, 2003 ; Limtong *et al.*, 2008).

L'espèce *T. delbrueckii* est très proche de l'espèce *S. cerevisiae* d'un point de vue morphologique et phénotypique, au point qu'elle était appelée, avant la classification de Kregger-Van Rij (1984), *Saccharomyces rosei*. Ceci est confirmé par Fugelsang (1997) qui propose une identification des levures du raisin et du vin basée sur une série d'observations morphologiques et de tests phénotypiques. *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* sont alors uniquement différenciées par leur capacité à assimiler la lysine (figure 7). L'espèce *T. delbrueckii* est également génétiquement proche de l'espèce *S. cerevisiae*, comme il a été rapporté par certains auteurs par comparaison de séquences (Belloch *et al.*, 2000; James *et al.*, 1996; Oda *et al.*, 1997).

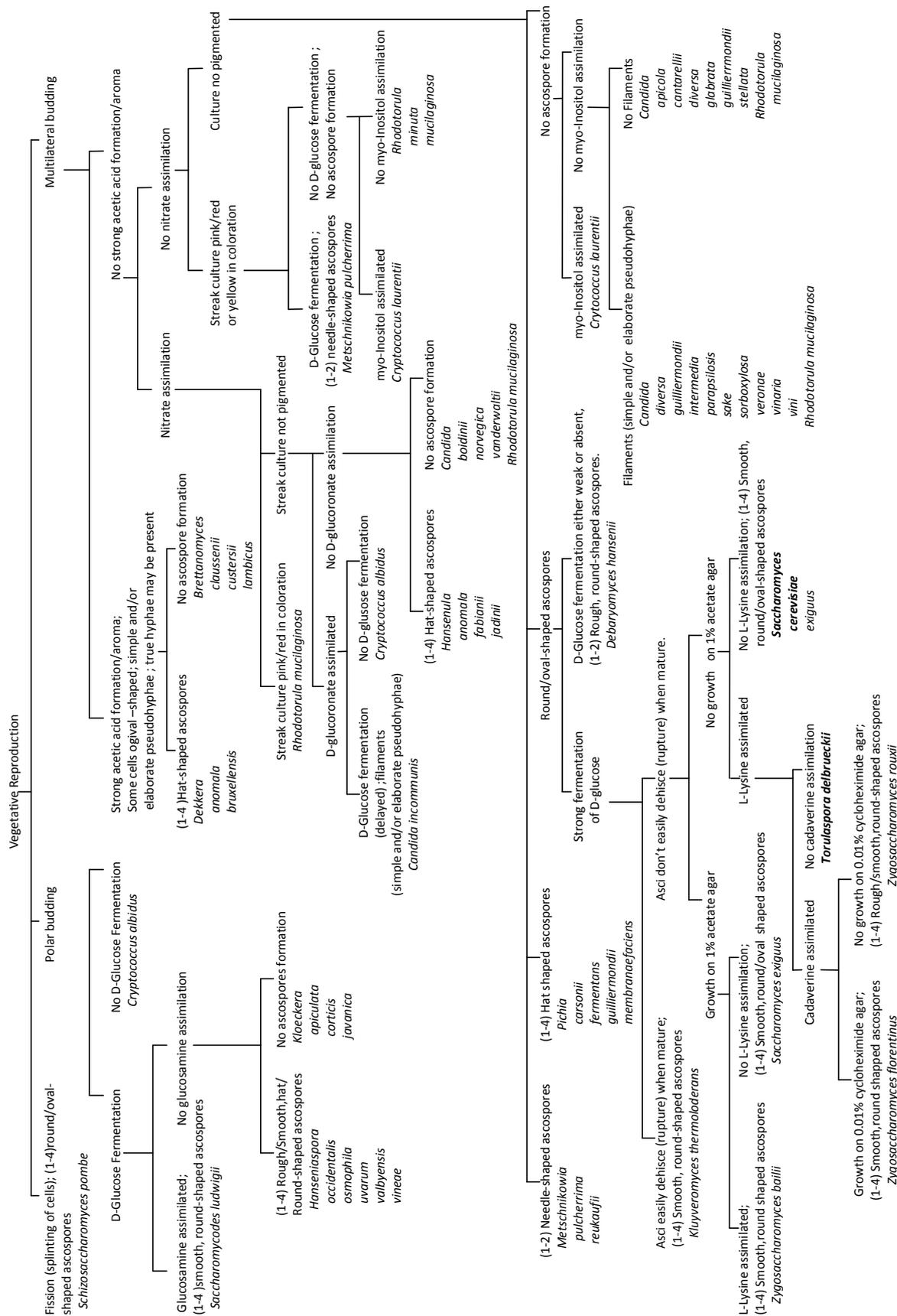


Figure 7 : Identification des levures du moût de raisin et du vin d'après Fugelsang (1997)

T. delbrueckii est une levure respiro-fermentaire, Crabtree positive, c'est à dire qu'elle est capable de dégrader les sucres par fermentation et respiration (Alves-Araujo *et al.*, 2007). Elle est caractérisée par des levures rondes de petites tailles produisant des ascospores ronds. Son génome est constitué de six chromosomes dont la taille est comprise entre 800 et 1600 kb (Oda et Tonomura, 1995).

Par ailleurs, la fabrication d'un hybride *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* par fusion de protoplastes est possible, et a permis d'obtenir une levure cumulant la résistance à l'éthanol de la souche *T. delbrueckii* et la capacité à dégrader le fructose de la souche *S. cerevisiae* (Santos *et al.*, 2008). En utilisant la même technique, Lucca *et al.* (1999) ont obtenu un hybride plus résistant au stress osmotique, en conditions de panifications, que les souches de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ayant servies à sa fabrication.

1.2 Ecologie

T. delbrueckii est une levure que l'on peut isoler à partir de nombreux produits alimentaires, comme les jus de fruits et les produits lactés (Rohm *et al.*, 1992). On la trouve aussi naturellement dans les moûts de raisin de différentes variétés et régions, même si elle ne constitue pas l'espèce majoritaire (Baleiras Couto *et al.*, 2005; Di Maro *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 1999; Ganga et Martinez, 2004; Gonzalez *et al.*, 2007; Xufre *et al.*, 2006). *T. delbrueckii* est également présente dans la pâte à pain de seigle ou de blé où elle est la levure non-*Saccharomyces* la plus abondante (Almeida et Pais, 1996b).

1.3 Résistance à différents stress

T. delbrueckii est une espèce qui présente des capacités de résistance à de nombreux stress. Elle a été décrite comme étant osmotolérante, cryotolérante et résistante aux sels. Grâce à ces propriétés, elle est utilisée de façon industrielle pour la formation de pâte à pain (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003 ; Lucca *et al.*, 1999 ; Oshima *et al.*, 1987).

Hernandez-Lopez *et al.* (2003) ont étudié la capacité de 2 souches de *T. delbrueckii* à lever la pâte à pain et l'ont comparée à celles de 2 souches de *S. cerevisiae* commercialisées pour la panification. Selon eux, *T. delbrueckii* présente une meilleure capacité, c'est-à-dire une meilleure production de CO₂ (ml CO₂/g de cellule), surtout pour des pâtes très sucrées (>300 g/L) grâce à sa meilleure capacité d'osmotolérance. Selon ces auteurs, le principal polyol

osmorégulateur chez *T. delbrueckii* est le glycérol (comme chez *S. cerevisiae*) mais ils ont également trouvé de faibles quantités d'arabinitol, de galactitol et de méthyl-galactitol.

Selon eux, la meilleure résistance au stress osmotique de *T. delbrueckii* s'explique par le fait que la réponse à ce stress est légèrement différente de celle de *S. cerevisiae*. D'une part, car elle augmente plus rapidement sa concentration intracellulaire de glycérol durant les premières heures du stress (taux de production 60-80 mg/min/g de cellule contre 20 à 30 pour *S. cerevisiae*) et cela malgré une concentration intracellulaire plus faible avant le stress osmotique (1mg/g de cellule contre 4mg/g de cellule pour *S. cerevisiae*). D'autre part, l'hyperaccumulation intracellulaire du glycérol continue pendant moins longtemps que chez *S. cerevisiae* ce qui entraîne une différence importante de concentration de glycérol dans le milieu extérieur.

Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que, contrairement à *S. cerevisiae* où le glycérol a un rôle dans le contrôle du potentiel d'oxydo-réduction (Ansell *et al.*, 1997), le glycérol joue uniquement un rôle dans l'ajustement osmotique chez *T. delbrueckii*.

D'autres auteurs ont émis la même hypothèse en étudiant la réponse au stress osmotique de *Zygosaccharomyces rouxii* (Shen *et al.*, 1999). Une autre hypothèse concernant cette espèce serait qu'elle retient mieux le glycérol à l'intérieur de la cellule (Zyl et Prior, 1990).

De plus, *T. delbrueckii* a souvent été décrite pour ses capacités de cryotolérance (Almeida et Pais, 1996a ; Sasaki et Ohshima, 1987). La congélation entraîne une fracture de la membrane cellulaire et une destruction de l'organisation cellulaire par formation de cristaux de glace (Grout *et al.*, 1990). Selon Hernandez-Lopez *et al.* (2003), *T. delbrueckii* est cryotolérante et conserve une meilleure activité fermentaire que *S. cerevisiae* après congélation. Ces résultats seraient liés à la capacité à préserver le tréhalose intracellulaire. En effet, le tréhalose est un composé impliqué dans la tolérance au stress chez *S. cerevisiae* (Singer et Lindquist, 1998), incluant le stress osmotique (Hounsa *et al.*, 1998) et la préservation de la viabilité lors de la congélation (Hino *et al.*, 1990). Chez *S. cerevisiae*, la mise en contact des levures avec les nutriments lors de la préparation de la pâte congelée entraîne une mobilisation rapide du tréhalose par hydrolyse et donc une perte de performance (Shima *et al.*, 1999; Van Dijck *et al.*, 1995). La stabilité des cellules de levures de *T. delbrueckii* lors de la congélation entraînerait donc une mobilisation plus lente du tréhalose lors de la fermentation et donc une perte de performance réduite (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). Ces résultats sont en accord avec Almeida et Pais (1996a) et Yokoigawa *et al.* (1995) qui ont montré que des souches cryotolérantes de *T. delbrueckii* avaient une plus faible activité tréhalase que des souches sensibles.

Par ailleurs, des tests de croissance sur milieux gélosés ont mis en évidence que *T. delbrueckii*, outre sa résistance au stress osmotique et au froid, a également des propriétés de résistance aux sels, propriétés importantes en panification, car elle peut se développer en présence de 2M de sorbitol, 2M de KCl, 2M de NaCl et 0,8M de chlorure de lithium, contrairement à *S. cerevisiae* rapidement inhibée (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003; Hernandez-Lopez *et al.*, 2007).

2 Connaissances œnologiques sur l'espèce *Torulaspora delbrueckii*

2.1 Aptitude fermentaire

Ciani et Maccarelli (1998) ont décrit la vigueur de fermentation comme la quantité maximale d'éthanol qu'une souche donnée est capable de produire en présence d'un excès de sucre. Ils ont ainsi montré, au cours de leurs travaux sur 90 souches de *T. delbrueckii*, que cette espèce est caractérisée par une grande hétérogénéité pour ce paramètre. En effet, la majorité des souches testées ont produit des quantités d'éthanol comprises entre 7 et 10 % (v/v). Certains auteurs ont cependant observé des productions supérieures d'éthanol par l'espèce *T. delbrueckii* : jusqu'à 12 % (v/v) (Cabrera *et al.*, 1988; Herraiz *et al.*, 1990) ce qui est particulièrement remarquable pour une levure non-*Saccharomyces*.

Par ailleurs, l'espèce *T. delbrueckii* est caractérisée par un taux de croissance et une population maximale plus faible que *S. cerevisiae* (Bely *et al.*, 2008; Ciani, 1997 ; Ciani *et al.*, 2006 ; Ciani et Picciotti 1995).

2.2 Propriétés aromatiques

Des études sur le profil aromatique des non-*saccharomyces* ont montré que l'espèce *T. delbrueckii* avait un impact positif sur la qualité organoleptique des vins (Ciani et Maccarelli, 1998; Ciani et Picciotti, 1995; Herraiz *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1991). En effet, cette espèce produit peu de composés défavorables à la qualité des vins comme l'acétaldéhyde, l'acétoïne, l'acide acétique, l'acétate d'éthyle et les phénols volatils (Cabrera *et al.*, 1988; Ciani *et al.*, 2006; Ciani et Maccarelli, 1998; Ciani et Picciotti, 1995; Herraiz *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1990; Peynaud, 1956; Plata *et al.*, 2003; Shinohara *et al.*, 2000).

Par ailleurs, des travaux ont été réalisés dans le but de comparer la production d'esters de 5 souches de *T. delbrueckii* et 9 souches de *S. cerevisiae*, au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu synthétique mimant la composition d'un moût (Viana *et al.*, 2008). Selon ces

auteurs, il n'y a pas de différence significative entre ces deux espèces concernant la production d'acétate d'esters (acétate d'éthyle, d'isobutyle, d'isoamyle et de 2-phényléthyle) mais *T. delbrueckii* produit moins de caproate d'éthyle et cinq fois plus de caprylate d'éthyle. D'autres auteurs, ayant également travaillé sur milieu synthétique ont mis en évidence une faible production d'esters fermentaires comme l'acétate d'isoamyle et les butyrate, hexanoate et octanoate d'éthyle pour 2 souches de *T. delbrueckii* (Hernandez-Orte *et al.*, 2008; Plata *et al.*, 2003). Deux autres études réalisées sur moûts avec une souche de *T. delbrueckii* ont mis en évidence une faible production d'esters par cette espèce (Herraiz *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1991).

Ces deux auteurs ont également évalué la production d'alcools supérieurs par *T. delbrueckii*. Selon Herraiz *et al.* (1990), *T. delbrueckii* produit plus de : 1-propanol, isobutanol, 3-ethoxy-1-propanol et 2 fois plus de phényl-2-éthanol (111 mg/L) que *S. cerevisiae* (58 mg/L). La production totale d'alcools supérieurs (308 mg/L) est alors supérieure à celle de *S. cerevisiae* (267 mg/L). Elle produit cependant moins de 2-méthyl-1-butanol et 3-méthyl-1-butanol. Moreno *et al.* (1991) trouvent des résultats similaires avec une production totale d'alcools supérieurs importante 434 mg/L comparée à 350 et 578 mg/L pour les deux souches de *S. cerevisiae* testées dans les mêmes conditions. Ils trouvent également une production de phényl-2-éthanol (37 mg/L) supérieure à celle des 2 *S. cerevisiae* : 20 et 9 mg/L. Enfin, selon Ciani et Picciotti (1995), une souche de *T. delbrueckii* a produit plus d'alcool isoamylique (42,4 mg/L) qu'une souche de *S. cerevisiae* (29,6 mg/L) lors de la fermentation alcoolique d'un moût stérilisé.

Par ailleurs, selon Hernandez-Orte *et al.* (2008), *T. delbrueckii* produit peu d'acides gras volatils comme les acides isovalérique, butyrique, hexanoïque, octanoïque et décanoïque. Seule la production d'acide isobutyrique (0,72 mg/L) et 2-méthylbutyrique (14,6 mg/L) est supérieure à celle de 2 souches de *S. cerevisiae*.

Ces auteurs ont également étudié l'aptitude de *T. delbrueckii* à libérer les arômes variétaux. Ainsi, selon Hernandez-Orte *et al.* (2008), *T. delbrueckii* est caractérisée par une forte activité β -glucosidase. La fermentation d'un milieu synthétique, auquel a été ajouté un mélange de précurseurs aromatiques extraits de 4 cépages différents, a permis de mettre en évidence la forte production par cette espèce de composés aromatiques tels que : le Riesling acétal, le vanillate d'éthyle, l'acétate de terpényle, la γ -nonalactone, la γ -déalactone, l'eugénol, le 2-phénoxyéthanol, le dihydrocinnamate d'éthyle, des actinidiols, le farnesol, la vanilline, l'isoeugénol, la 3-oxo- β -ionone et l' ∞ -terpinéol. Toujours selon ces auteurs, les vins obtenus sont alors caractérisés par des arômes de fruits secs et de noix de coco.

De plus, la croissance d'une souche de *T. delbrueckii* sur un milieu minimum supplémenté en monoterpènes d'alcool a permis de mettre en évidence une capacité de biotransformation de ces molécules par cette espèce, ce qui peut entraîner une modulation du type et de l'intensité aromatique des vins (King et Richard Dickinson, 2000). Par exemple, selon ces auteurs, *T. delbrueckii* peut transformer le géraniol en linalol et ∞ -terpinéol mais pas en citronellol contrairement à *S. cerevisiae* qui le transforme en ces trois composés. La fermentation par *T. delbrueckii* pourrait donc orienter le profil aromatique des vins vers des arômes frais de fleurs et de coriandre (linalol) au détriment des arômes de rose et de citron caractéristiques du citronellol. Par ailleurs, *T. delbrueckii*, tout comme *S. cerevisiae*, peut transformer le linalol et le nérol en ∞ -terpinéol.

Cependant, malgré un nombre conséquent d'études, la majorité des auteurs n'ont utilisé qu'une souche de *T. delbrueckii* au cours de leurs travaux qui sont tous réalisés sur des matrices différentes et selon des conditions de fermentation différentes. Il est donc difficile d'établir un profil aromatique caractéristique de cette espèce. Les auteurs s'accordent cependant à dire que l'espèce *T. delbrueckii* est caractérisée par une faible production de composés à défauts olfactifs comme l'acétaldéhyde, l'acétoïne, l'acétate d'éthyle et l'acide acétique (Bely *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 1988; Ciani *et al.*, 2006; Ciani et Maccarelli, 1998; Ciani et Picciotti, 1995; Herraiz *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1990; Peynaud, 1956; Plata *et al.*, 2003; Shinohara *et al.*, 2000) ce qui est bénéfique pour la qualité des vins.

2.3 Capacité fructophile / Relance de fermentation

La capacité de l'espèce *T. delbrueckii* à relancer une fermentation arrêtée a été évaluée (Santos *et al.*, 2008). Il apparaît que *T. delbrueckii*, bien que plus résistante à de fortes concentrations d'éthanol que *S. cerevisiae*, s'est révélée incapable de consommer entièrement 25 g/L de fructose lorsque des levures en phase exponentielle de croissance sont introduites dans un milieu simulant un moût arrêté (pas de glucose, éthanol 12%vol., 0,6 g/L acide acétique, 25 g/L fructose, dans un milieu de base YPD), contrairement à *S. cerevisiae*.

Dans cette même étude, les auteurs ont remarqué chez *S. cerevisiae*, que plus les différents transporteurs de glucose étaient inhibés, plus il restait de fructose résiduel. En effet, le fructose est transporté à l'intérieur de la cellule par les transporteurs de glucose car il n'existe pas de transporteur de fructose spécifique chez *S. cerevisiae* (Reifenberger *et al.*, 1997) ni chez *T. delbrueckii* (Alves-Araújo *et al.*, 2005). Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que les

transporteurs de glucose de *T. delbrueckii* étaient plus sensibles à l'éthanol que ceux de *S. cerevisiae*.

2.4 Résistance à l'éthanol

Selon Pina *et al.* (2004), *T. delbrueckii* présente une grande sensibilité à l'éthanol. Cependant leur expérimentation a été réalisée sur un milieu contenant 22,5 % vol. éthanol différent des conditions oenologiques. De plus, ces travaux sont contradictoires avec ceux de Bely *et al.* (2008) qui ont montré, lors de fermentation en co-inoculation avec *S. cerevisiae*, que des souches de *T. delbrueckii* sont capables de survivre à 14% vol. éthanol même si leur propre niveau de production est inférieur. Enfin, selon Santos *et al.* (2008), *T. delbrueckii* est plus résistante à de fortes concentrations d'éthanol que *S. cerevisiae*. La résistance a été évaluée dans ce cas par la capacité de survie de levures en phase exponentielle de croissance introduites dans un milieu synthétique contenant 18% vol. éthanol plus 0,6 g/L d'acide acétique. *T. delbreckii* conserve alors 100% de viabilité après 2h contre uniquement 10% de viabilité pour *S. cerevisiae*.

2.5 Membrane plasmique : besoin en oxygène

La membrane plasmique, composée de lipides et protéines, est un organite essentiel pour la vie de la levure car elle constitue une barrière hydrophobe et régule les échanges entre la levure et le milieu extérieur. La partie lipidique des phospholipides membranaires est composée essentiellement d'acides gras en C16 ou C18 qui peuvent être saturés, comme l'acide palmitique et stéarique, ou insaturés comme l'acide oléique, linoléique et linoléique. La synthèse des acides gras insaturés et de l'ergostérol, jouant sur la fluidité membranaire, nécessite la présence d'oxygène. Le fonctionnement des protéines de transport est fortement influencé par la fluidité des membranes. Ainsi, l'enrichissement en acide gras insaturés favorise la pénétration et l'accumulation de certains acides aminés (Henschke et Rose, 1991). De même, une teneur importante en ergostérol et un taux d'insaturation des phospholipides membranaires élevé favorise la pénétration du glucose dans la cellule, surtout pendant la phase stationnaire et de déclin ; ce phénomène explique l'influence déterminante de l'aération pendant la phase de multiplication des levures sur l'achèvement de la fermentation alcoolique (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

Mauricio *et al.* (1991), ont comparé la croissance et la conduite de la fermentation, sur un moût de raisin, d'une souche de *T. delbrueckii* et d'une souche de *S. cerevisiae* dans

différentes conditions : anaérobie stricte et semi-aérobie avec ajout ou non d'ergostérol ou d'ergostérol plus acide oléique. Ils ont ainsi mis en évidence des différences entre les deux espèces. En conditions semi-aérobies, les deux espèces synthétisent assez d'ergostérols et de phospholipides pour leur croissance et le bon déroulement de la fermentation (13 et 10% vol. éthanol pour respectivement *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*). L'addition d'ergostérol et d'acide oléique dans ces conditions modifie peu la croissance et la capacité fermentaire. Un excès d'ergostérol peut même ralentir la croissance cellulaire, les phospholipides étant alors le facteur limitant. En conditions anaérobies strictes, la biosynthèse des stérols et acides gras insaturés est inhibée pour les deux espèces, ce qui entraîne une diminution de l'ergostérol et des phospholipides internes. L'inhibition est complète pour *T. delbrueckii* qui stoppe très vite sa croissance (1,8 génération en 5 jours contre 8,6 générations en conditions semi-aérobies). *S. cerevisiae* réalise 5,8 générations en 5 jours en conditions anaérobies contre 8,8 en conditions semi-aérobies.

Dans ces conditions, une aération du moût induit la biosynthèse d'ergostérol et de phospholipides par les deux espèces, cependant la croissance cellulaire de *T. delbrueckii* est plus stimulée que celle de *S. cerevisiae*. De plus, les deux levures ont une croissance globale similaire à la fin de la fermentation bien que *S. cerevisiae* commence sa croissance avant l'aération et *T. delbrueckii* après, ce qui illustre sa plus grande dépendance à l'oxygène.

Si l'ergostérol est ajouté seul en conditions anaérobies, il s'accumule à l'intérieur de la cellule et augmente la croissance des deux espèces. Par contre, il inhibe la fermentation chez *T. delbrueckii* probablement car son accumulation diminue la fluidité membranaire, ce qui gêne l'entrée du glucose. Par contre, dans ces conditions, l'ajout cumulé d'ergostérol et d'acide oléique augmente l'activité fermentaire des deux espèces. Chez *S. cerevisiae*, elle est alors similaire à celle obtenue en conditions semi-aérobies alors que, chez *T. delbrueckii*, la production d'alcool obtenue représente seulement 58% de celle en conditions semi-aérobies. Dans ces conditions, la population de *S. cerevisiae* est similaire à celle en conditions semi-anaérobies alors que pour *T. delbrueckii*, elle est inférieure.

En conclusion, les auteurs ont démontré que l'effet inhibiteur de l'anaérobiose sur la croissance et l'activité fermentaire peut être compensé, chez *S. cerevisiae*, par l'addition d'ergostérol et d'acide oléique, ce qui n'est pas le cas chez *T. delbrueckii* qui a absolument besoin d'oxygène pour le bon déroulement de sa croissance et de son activité fermentaire. Ces résultats sont en accord avec Visser *et al.* (1990) qui ont mis en évidence que *T. delbrueckii* présentait un très faible taux de croissance, sur un milieu minéral supplémenté en Tween 80 et ergostérol, en conditions anaérobies, alors qu'elle présente un taux de croissance élevé sur le

même milieu en conditions aérobies. Par ailleurs, selon Mauricio *et al.* (1991), la faible capacité des *T. delbrueckii* à synthétiser des stérols et des phospholipides en conditions anaérobies ainsi que son besoin élevé en oxygène pour assurer sa croissance, sont impliqués dans la disparition de cette espèce au cours de la fermentation alcoolique lorsque l'oxygène dissout disparaît. Cette hypothèse est confirmée par Hansen *et al.* (2001) qui ont mis en évidence que *T. delbrueckii* était moins tolérante à l'affaiblissement du taux d'oxygène disponible que *S. cerevisiae*. Selon ces auteurs, la disparition de l'oxygène résiduel du moût, provoqué par la croissance importante de *S. cerevisiae* en co-inoculation avec *T. delbrueckii*, conduit à la mort précoce de cette dernière.

2.6 Facteur killer

Peu d'études sur les interactions de type killer ont exploré les caractères de *T. delbrueckii*. Une souche *T. delbrueckii*, testée par Heard et Fleet (1987) ne s'est révélée ni killer, ni sensible vis-à-vis de nombreuses espèces prises en compte. Dans une autre étude, deux souches *T. delbrueckii* se sont révélées sensibles à l'activité killer de certaines souches appartenant aux genres *Pichia* et *Kluyveromyces* (Yap *et al.*, 2000).

2.7 Inoculation mixte et interaction entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*

T. delbrueckii est une espèce qui a attiré l'attention de nombreux chercheurs en oenologie notamment pour sa faible production d'acide acétique. Certains auteurs ont alors démontré qu'il était possible de réduire l'acidité volatile des vins standards ou à hautes concentrations en sucres (vin liquoreux) en réalisant des inoculations mixtes *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* (Bely *et al.*, 2008; Ciani *et al.*, 2006; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1981). Ainsi, la co-inoculation, c'est-à-dire l'inoculation simultanée de 2 types de levure, réalisée avec les levures *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* sur un moût liquoreux de Sauternes a permis la réduction de l'acidité volatile jusqu'à 55%, par rapport à une inoculation avec *S. cerevisiae*, et l'obtention des 14 % vol. éthanol désirés (Bely *et al.*, 2008). Selon ces mêmes auteurs, le système d'inoculation séquentiel, avec ajout de la souche *S. cerevisiae*, cinq jours après inoculation de la souche *T. delbrueckii*, est moins performant puisqu'il conduit à une production d'acidité volatile plus importante que la modalité en co-inoculation et engendre surtout un arrêt de fermentation. Ces résultats sont en accord avec Ciani *et al.* (2006) qui ont observé une

réduction d'AV en co-inoculation et en inoculation séquentielle. Cependant, cette dernière modalité conduit également à un arrêt de fermentation. Selon ces auteurs, la persistance accrue des *T. delbrueckii* lors de l'inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae* limite la bonne implantation (taux de croissance et population maximale plus faible qu'en co-inoculation) de cette dernière, engendrant une fermentation languissante avec du fructose résiduel en fin de fermentation. En effet, en inoculation séquentielle *T. delbrueckii* est l'espèce dominante, en terme de population, pendant 10 jours et persiste dans le milieu pendant 28 jours avant de dépérir, alors qu'elle commence à mourir après seulement 14 jours en co-inoculation. Selon Bely *et al.* (2008), la souche de *T. delbrueckii* utilisée en culture pure commence à mourir après 6 % vol. éthanol alors qu'en culture mixte elle subsiste à un niveau plus élevé jusqu'à l'arrêt de la fermentation alcoolique à 14 % vol. éthanol.

Ces résultats sont en désaccord avec d'autres auteurs qui ont observé une inhibition de la croissance et une mort précoce de l'espèce *T. delbrueckii* en présence de concentrations élevées de *S. cerevisiae*. Ces auteurs ont alors associé cette inhibition à un phénomène de cell-cell contact et de compétition pour l'espace entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* dont la croissance n'est pas affectée par la présence de *T. delbrueckii* (Nissen et Arneborg, 2003; Nissen *et al.*, 2003). Par ailleurs, Albergaria *et al.*, (2010) ont mis en évidence qu'une souche de *S. cerevisiae* était capable de produire un peptide pouvant inhiber la croissance de *T. delbrueckii* en conditions œnologiques. D'autres auteurs attribuent la mort précoce d'une souche de *T. delbrueckii*, lors de co-inoculations avec *S. cerevisiae*, non pas à la présence de composés toxiques mais à un manque d'oxygène (Hansen *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces travaux donne des résultats contradictoires. En effet, pour certains *T. delbrueckii* est rapidement inhibée par *S. cerevisiae* par différents mécanismes, alors que pour d'autre la persistance de *T. delbrueckii* est accrue par la présence de *S. cerevisiae* dont la croissance peut être affectée. On peut cependant penser que l'interaction entre ces levures dépend de la souche de *T. delbrueckii* et de la souche de *S. cerevisiae* utilisées mais également du taux et du mode d'inoculation.

Matériels et méthodes

I Matériel biologique

Le nombre de souches de *T. delbrueckii* disponibles pour effectuer les diverses expériences a évolué au cours des trois années de thèse. En effet, une quinzaine de souches étaient disponibles à l'origine pour atteindre trente à l'heure actuelle. Ceci explique le fait que les souches ne sont pas toujours les mêmes selon les expériences, d'autant plus qu'il est techniquement impossible de tester toutes les souches pour chaque expérience.

Nous avons ainsi utilisé, au cours de nos travaux, trente souches de l'espèce *Torulasporea delbrueckii* provenant de produits alimentaires variés et douze souches appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, testées dans les mêmes conditions. Ces souches sont présentées dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées.

Espèces	Souches		Provenance	Origine
	Dénomination utilisée	Dénomination officielle		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SB	SB	IOEB	(Marullo et al.,2004)
	ST	Zymaflore ST	Laffort	Terroirs blanc (Sauternes)
	VL3	Zymaflore VL3		Terroirs blanc (Bordeaux)
	X5	Zymaflore X5		Breeding
	VL1	Zymaflore VL1		Terroirs blanc (Bourgogne)
	BO213	Actiflore BO213		nd
	X16	Zymaflore X16		Breeding
	F33	Actiflore F33		nd
	Fermichamp	Fermichamp		DSM Food specialities
	CLIB 154	CLIB 154	CIRM	nd
	X2180	X2180	YGS	nd
	S101	St Georges S101	Bio Springer	nd

Bio Springer, France : souche commerciale

CIRM-Levures: Centre international de ressources microbiennes, Thivernal-Grignon, France

DSM Food specialities, Pays-bas: souche commerciale

IOEB: Collection de la faculté d'oenologie de l'Université de Bordeaux, France

Laffort, France: souches commerciales

YGS: Yeast Genetic Stock, Berkley

Tableau 5 : Souches de *Torulaspora delbrueckii* utilisées.

Espèces	Souches		Provenance	Origine	
	Dénomination utilisée	Dénomination officielle			
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	IFR5	IFR 5	DGAM	Moût Tokaj	
	IFR7	VFR 7		Moût Tokaj	
	AN04 Y01	AN04 Y01	ADRIA	Cidre	
	AN07 Y01	AN07 Y01		Yaourt	
	CLIB 230	CLIB 230	CIRM	nd	
	CLIB 503	CLIB 503		Raffinerie sucre	
	CLIB 504	CLIB 504		Riz fermenté	
	CLIB 505	CLIB 505		Lait fermenté	
	CLIB 506	CLIB 506		Datte	
	CLIB 507	CLIB 507		Raisin	
	A2	CLIB 1134		Baie raisin (Bourgogne)	
	B8	CLIB 1135		Baie raisin (Bourgogne)	
	C7	CLIB 1136		Baie raisin (Bourgogne)	
	D7	CLIB 1137		Baie raisin (Bourgogne)	
	E7	CLIB 1138		Baie raisin (Bourgogne)	
	31703	MUCL 31703		MUCL	Moût Bordeaux
	27828	MUCL 27828			nd
	Cbm621	L0470	IOEB	Moût Bordeaux	
	Lm1T10	L0544		Moût Bordeaux	
	Lm2T7	L0543		Moût Bordeaux	
	Lm1T20	L0631		Moût Bordeaux	
	GI 1	L0630		Moût Bordeaux	
	OXT 1 1//2	L0705		Moût Bordeaux	
	OXT 1 18//33	L0703		Moût Bordeaux	
	OXT 1 2//3	L0704		Moût Bordeaux	
	OXT 5 6//3	L0706		Moût Bordeaux	
	POM J2	L0707		Moût Bordeaux	
	CBS	CBS 3085		CBS	Moût Bordeaux
	A	nd	Commerciale	nd	
	B	nd		nd	

ADRIA : Adria-Normandie, secteur recherche et développement, Villers-Bocage, France

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Pays-bas

CIRM-Levures: Centre international de ressources microbiennes, Thivernal-Grignon, France

DGAM: Department of genetics and applied microbiology, University of Debrecen, Hungary

IOEB: Collection de la faculté d'oenologie de l'Université de Bordeaux, France

MUCL: Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Belgique

Les levures sont stockées à -20°C et -80°C dans des tubes de cryoconservation NUNC™ (Nunc A/S, Roskilde, Danemark), contenant un milieu riche YPD (extrait de levure 10g/L, bactopeptone 10g/L, D-glucose 20g/L), supplémenté en glycérol (50%), qui protège les cellules de l'éclatement par le froid.

Avant utilisation, les souches sont repiquées stérilement sous hotte à flux laminaire (Steril Antares catégorie 2, NF X44-201) et sur milieu complet YPDA (extrait de levure 10g/L, bactopeptone 10g/L, D-glucose 20g/L, agar 20g/L). Tous les milieux de culture employés dans cette étude sont autoclavés 30 min à 110°C.

II Milieu de fermentation

1 Milieu synthétique

Afin de comparer les différentes expériences entre elles et avoir un milieu stable sur une durée de trois ans, l'utilisation d'un milieu synthétique est indispensable. Le milieu synthétique utilisé est semblable à un moût blanc. Il a été mis au point par Bely *et al.* (1990a, 1990b) et modifié par Marullo *et al.* (2006). Les principaux composés nécessaires à la fermentation y sont réunis : sources de carbone et d'azote, sels minéraux, oligo-éléments et vitamines.

Des ajustements de la teneur en glucose et fructose ont été réalisés selon les modalités des tests de fermentation. La majorité des expériences sur milieu synthétique ont été réalisées avec le milieu ajusté à 240 g/L de sucres. Ce milieu sera appelé milieu synthétique MS.

La composition du milieu est la suivante :

- **Sucres** : concentration finale de 120, 240 ou 350 g/L avec des concentrations de glucose et fructose toujours similaires (D-glucose 60, 120 ou 175 g/L, D-fructose 60, 120 ou 175 g/L) ;
- **Acides organiques** : acide tartrique 3 g/L, acide citrique 0,3 g/L, acide L-malique 0,3 g/L ;
- **Substrats azotés** : 190 mg/L d'azote assimilable apporté par 0,30 g/L de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (équivalent à 63,6 mg/L d'azote assimilable) et 9,25 ml/L d'une solution mère de 18 acides aminés (équivalent à 127,2 mg/L d'azote assimilable) comprenant en g/L : 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), Histidine (2,5), Lysine (1,3) et Cystéine (1) ;
- **Sels minéraux** (en mg/L): phosphate de potassium KH_2PO_4 (2000), sulfate de magnésium $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (200), sulfate de manganèse $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4), sulfate de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4), sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1), iodure de potassium KI (1), chlorure de cobalt $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4), molybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1), acide borique H_3BO_3 (1) ;
- **Vitamines** : meso-inositol 0,3 g/L, biotine 40 µg/L, thiamine 1 mg/L, pyridoxine 1 mg/L, acide nicotinique 1 mg/L, acide pantothénique 1 mg/L, acide para-aminobenzoïque 1 mg/L ;

Le pH du milieu est ajusté 3,3 par des pastilles de potasse KOH, puis le milieu est stérilisé par filtration sur membrane de nitrate de cellulose 0,45 µm (Millipore, France) ;

Le milieu est alors enrichi en facteurs anaérobies : ergostérol (1,5 mg/L), oléate de sodium (0,5 mg/L) et Tween 80 (0,05 mL/L) qui permettent de s'affranchir de l'aération nécessaire au bon déroulement de la fermentation, et en dioxyde de soufre (20 mg/L), conformément aux pratiques œnologiques.

2 Moûts

Différents moûts ont été utilisés au cours de cette étude. Leur teneur en azote initiale a été systématiquement ajustée à 200 mg/L d'azote assimilable par ajout de Thiazote® (Laffort) qui est un mélange de sulfate d'ammonium (source d'azote) et de thiamine (vitamine B1). Les moûts utilisés étaient congelés ou frais et issus des différents cépages suivants : Colombard, Sémillon, Sauvignon blanc ou Merlot.

Les caractéristiques de chaque moût (cépage, congélation ou non, concentration en sucres, température initiale...) seront précisées pour chaque expérience.

Les moûts issus de vendanges botrytisées de l'appellation de Sauternes, utilisés au cours de nos expériences, seront appelés sous le terme de « moût liquoreux ».

III Fermentations

1 Pré-culture

1.1 Au laboratoire

Afin de faciliter l'adaptation des levures au milieu de fermentation (passage de cultures sur milieux gélosés au milieu de fermentation liquide) et d'augmenter la quantité de levures nécessaire à l'inoculation des différentes fermentations, les levures sont pré-cultivées pendant 24h à 24°C sous agitation mécanique (table agitante Orbital shaker S01, Stuart Scientific) à 150 rpm ou magnétique (table magnétique multi spots Variomag multipoint, Thermo Scientific) à 200 rpm. Les pré-cultures (levains) sont toujours réalisées à partir du milieu de fermentation c'est à dire du milieu synthétique ou du moût. Pour les fermentations réalisées sur milieu synthétique, le milieu de pré-culture est le milieu synthétique sans ajout des facteurs anaérobies et du SO₂. Les expériences réalisées sur moûts liquoreux sont inoculées à partir de pré-cultures réalisées sur le milieu de fermentation dilué au demi avec de l'eau.

Après 24 h, la concentration cellulaire viable de chaque levain est estimée par un compteur de particules Counter Coulter (cellules totales/mL) et par l'estimation de la viabilité cellulaire par la méthode du bleu de méthylène. Dans ces conditions, la détermination précise de la concentration cellulaire permet d'introduire un nombre identique de cellules viables, paramètre indispensable pour comparer finement les cinétiques de fermentation.

1.2 En chai

Les essais réalisés en chai ont été inoculés à partir de « crème de levure » ou de levures sèches actives (LSA) avec ou sans pré-culture préalable. L'estimation de la population viable contenue dans la crème de levure (produite en bioréacteur) ou dans la pré-culture, est estimée selon la même méthode que pour les pré-cultures réalisées au laboratoire. L'estimation de la population à partir de LSA est estimée par étalement sur boîte avec milieu YPDA (voir chapitre IV/3/1 ci-dessous).

2 Suivi des fermentations

2.1 Suivi manuel : Erlenmeyer ou bouteille

Les fermentations sont réalisées dans des Erlenmeyers de 100 mL dans lesquels sont versés stérilement 75 mL de milieu inoculés avec 10^6 ou 10^7 cellules viables/mL à partir des pré-cultures. Les micro-vinifications sont réalisées en triplicata, à température constante (17 ou 24°C selon les expériences) grâce à l'utilisation d'étuves (Binder, Allemagne) et sous agitation (magnétique ou mécanique).

La mesure régulière (une à deux fois par jour) de la perte de poids occasionnée par le dégagement de CO₂ (produit lors de la dégradation des sucres et proportionnel à la quantité d'éthanol formé) permet le suivi de la cinétique de fermentation alcoolique. La perte de poids par évaporation est inférieure à 2%. Lorsque le dégagement de CO₂ cesse, le milieu fermenté est centrifugé à 6000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est conservé à -20°C jusqu'au moment des analyses.

La majorité de nos expériences ont été réalisées dans des Erlenmeyers. Cependant, certaines expériences nécessitant des volumes de fermentation plus conséquents ont été réalisées dans des bouteilles de 0,25 à 1,5 L. Il est important de noter que la fermentation dans les bouteilles rend l'agitation impossible.

Les différents contenants utilisés sont toujours remplis de façon à garder un volume liquide/air similaire (environ 0,86).

Les modalités de fermentation seront précisées pour chaque expérience.

2.2 Suivi automatisé : Fermenteur 1,2 L

Les fermentations sont réalisées dans des fermenteurs de 1,2 litre placés sur une installation permettant le suivi en ligne et simultané de 16 fermenteurs. Chaque fermenteur est installé sur une balance de précision (Sartorius GP3202, France) qui permet le suivi de la fermentation par mesure de la perte de poids due au dégagement de CO₂.

Le logiciel mis au point spécifiquement pour cette installation (Fermenteur version V4.0-2008, Alliance Automation, France) permet, d'une part, d'ajuster la température des fermenteurs par pilotage d'ampoules infrarouges (100 Watt) et, d'autre part l'acquisition automatique du poids des fermenteurs toutes les vingt minutes (figure 8).

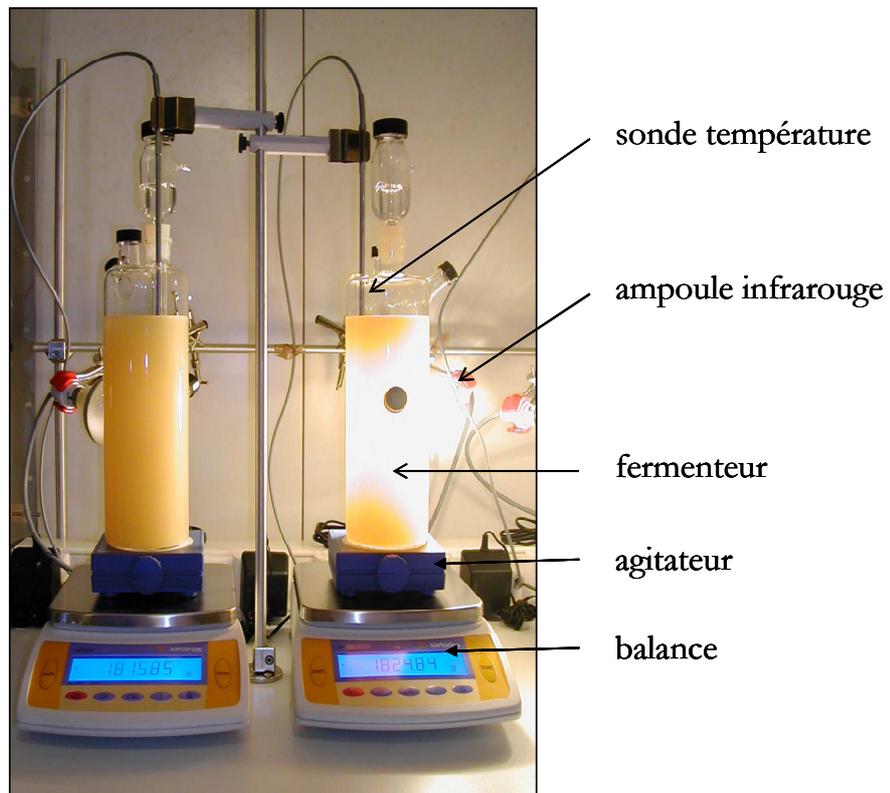


Figure 8 : Installation permettant le suivi automatisé de la fermentation alcoolique (fermenteur 1,2L).

Il est alors possible de mesurer la perte cumulée de CO₂ mais également d'évaluer sa vitesse de production (dCO₂/dt) par lissage polynomial des 11 dernières acquisitions du poids. Le nombre d'acquisitions et la précision des balances (0,01 g) permettent le calcul de paramètres cinétiques avec une grande précision (figure 9).

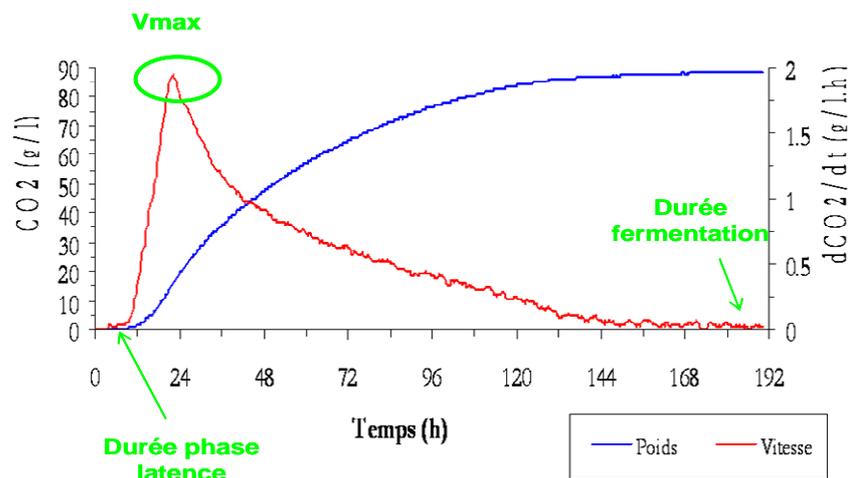


Figure 9 : Paramètres cinétiques obtenus par l'installation permettant le suivi automatisé des fermentations : Vitesse (g CO₂/L/h) et CO₂ dégagé (g/L) en fonction du temps (h).

Les coefficients de variation des paramètres cinétiques que l'on discutera dans ce travail sont de 10,6 % pour la durée de la phase de latence, 2 % pour le Vmax (vitesse maximale) et 1,5 % pour la durée de fermentation.

Les conditions de remplissage sont contrôlées afin de garder un rapport volume de liquide sur volume d'air similaire aux Erlenmeyers et bouteilles. Le milieu est homogénéisé par rotation à 200 tours par minute à l'aide d'un barreau aimanté actionné par un agitateur magnétique installé sur la balance de précision. Enfin, les fermenteurs sont munis d'un orifice (septum) qui permet de prélever stérilement de petites fractions de milieu en cours de fermentation. Le logiciel tient compte de la perte de poids, due aux prélèvements, dans les calculs de cinétiques.

Le fermenteur à double compartiment, dont la mise au point fait l'objet du chapitre V de la partie Résultats et Discussion, sera intégré dans cette installation automatisée.

2.3 Suivi manuel de la densité : barrique ou cuve

Des essais en chais ont été réalisés au cours de cette thèse, c'est-à-dire dans des conditions réelles de vinification. Ces essais ont été réalisés en cuve inox de 200 L ou en barrique bordelaise de 225 L. Dans ces conditions, le suivi de la fermentation ne se fait pas par suivi de la perte du poids mais par un suivi journalier de la densité couplé à une mesure de la température du moût.

IV Dénombrement de la concentration cellulaire

Le suivi de la concentration cellulaire a été réalisé de différentes façons selon les expériences. Dans la majorité des cas, pour les cultures pures (fermentation avec inoculation d'une seule souche de levure), la concentration cellulaire a été évaluée par détermination du nombre total de cellules/mL grâce à un compteur à particules couplé à une estimation de la viabilité par l'utilisation de bleu de méthylène. La combinaison de ces deux techniques permet d'obtenir la concentration en cellules viables/mL. Cependant, elle ne permet pas de mesurer deux populations de levures différentes dans un même milieu (cas des co-inoculations) mais uniquement le nombre de cellules totales du mélange. Dans ce cas, le dénombrement se fait par étalement sur milieux gélosés.

1 Coulter Counter (compteur à particules)

Le Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter) est un appareil permettant de compter et de mesurer la taille des cellules (ainsi que le volume cellulaire) dans une solution (figure 10).



Figure 10 : Compteur à particules Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter).

La cellule de mesure est constituée par une sonde en verre percée d'un orifice de quelques dizaines de microns de diamètre et de deux électrodes : une située à l'intérieur de la sonde (cathode) et l'autre à l'extérieur (anode) (figure 11).

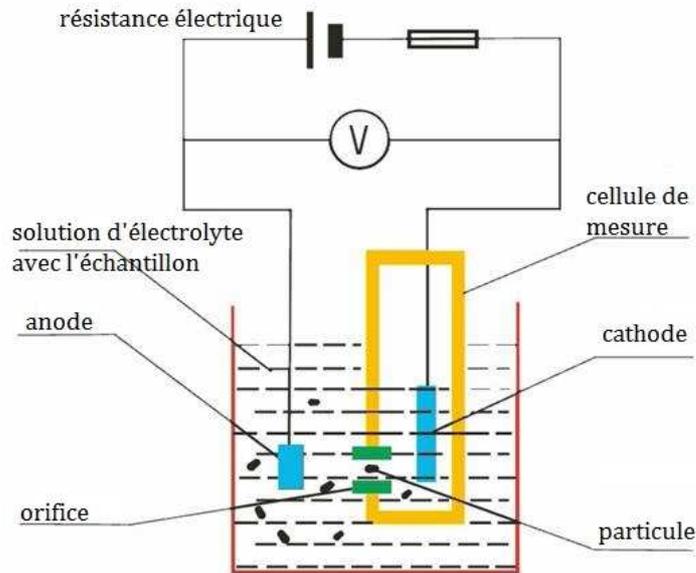


Figure 11 : Schéma de la cellule de mesure du Coulter Counter Z2.

Pour réaliser une mesure, la sonde est plongée dans la suspension à étudier, diluée dans une solution d'électrolyte (isoton), et l'appareil aspire un volume de 500 μL à travers la sonde. Les particules n'étant pas conductrices, provoquent un pic de résistance qui sera analysé et compté lors du passage à travers la sonde. La valeur de l'impulsion de la résistance est proportionnelle à la taille de la particule. Il est alors possible de connaître le nombre de cellules/mL, le volume occupé par la population levurienne ($\mu\text{m}^3/\text{mL}$), la taille moyenne des levures...(figure 12).

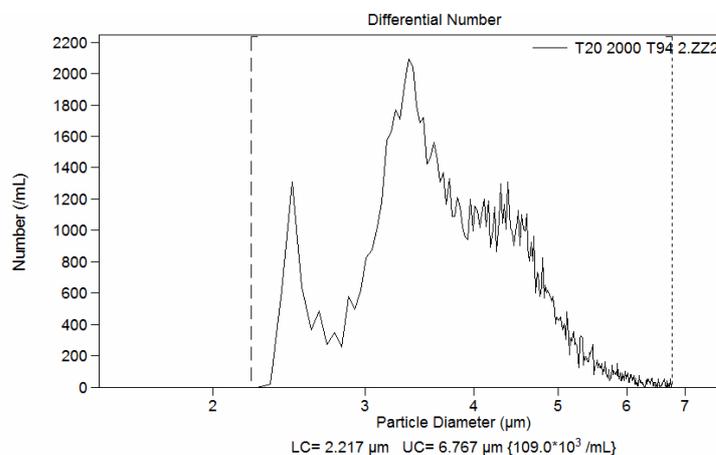


Figure 12: Graphique représentant le nombre de cellules/mL en fonction de leur diamètre, Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter).

Le diamètre de l'orifice est choisi au moment de l'achat de l'appareil (l'orifice de l'appareil du laboratoire présente un diamètre maximum de 9 µm). Les bornes de mesure sont délimitées et choisies avant l'analyse : entre 2,1 et 6,3 µm pour *T. delbrueckii* (sa taille moyenne étant de 3 à 5 µm) et entre 3 et 9 µm pour *S.cerevisiae* (taille entre 4 et 7 µm).

Il y a trois inconvénients principaux sur cet appareil. Le premier est qu'il ne différencie pas les cellules mortes des cellules viables et le deuxième est qu'il ne compte pas les amas de levures, ce qui entraîne une perte de données dans le cas de cellules floculantes. Le Coulter Counter Z2 ne peut également être utilisé pour la quantification des levures dans les milieux avec de nombreuses particules en suspension comme dans les moûts liquoreux.

2 Estimation de la viabilité cellulaire

Elle se fait par observation microscopique (Novex-Holland, B-series, Pays-Bas) en présence de bleu de méthylène.

La composition de la solution de bleu de méthylène utilisée est la suivante : 2 g de citrate de sodium ($C_6H_5Na_3O_7, 2H_2O$) ; 10 mL de bleu de méthylène à 1 g/L et de l'eau (qsp 100mL).

L'échantillon à analyser est dilué au demi par cette solution de bleu de méthylène et déposé sur lame pour observation au microscope (x400). Le bleu de méthylène pénètre dans les cellules où il est réduit sous forme incolore dans les cellules en activité. Les cellules mortes ne possédant pas d'activité enzymatique ne modifient pas ce colorant qui reste bleu. Le taux de viabilité est calculé en divisant le nombre de cellules vivantes par le nombre total de cellules .

3 Dénombrement sur milieux gélosés

3.1 Milieu pour la culture des levures totales

L'estimation de la population levurienne totale, lors des expériences sur milieu synthétique, est réalisée par étalement sur boîte de pétri contenant le milieu YPDA constitué de 10 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de bactopeptone, 20 g/L de D-glucose et 20 g/L d'agar.

Contrairement au milieu synthétique qui est stérile, le moût contient une population microbienne plus ou moins importante. Pour dénombrer la population levurienne totale présente dans un moût, il convient d'utiliser le milieu « levure totale » qui est constitué du milieu de base YPDA supplémenté par un antifongique : le biphényl (150 mg/L, Fluka, France) et un antibiotique : le chloramphénicol (1 mg/L, Sigma Aldrich, France) qui permettent d'inhiber la croissance des champignons et bactéries contenus dans le moût.

Le dénombrement est effectué par étalement en surface grâce à des billes stériles, de plusieurs dilutions successives de l'échantillon, puis comptage des colonies des boîtes de pétri après 48 h à 25°C. Les boîtes comptables sont celles possédant entre 15 et 300 colonies. La concentration cellulaire est alors exprimée en UFC/mL.

3.2 Milieu non-*Saccharomyces*

Classiquement, le milieu commercial « lysine » (Oxoid) est utilisé comme milieu non-*Saccharomyces* mais nous avons observé la croissance de certaines souches de *S. cerevisiae* sur ce milieu lors d'études préliminaires. Le milieu non-*Saccharomyces* que nous avons choisi d'utiliser, pour les expériences réalisées sur milieu synthétique, est un milieu YPDA auquel on ajoute du cycloheximide (actidione) qui est un antibiotique inhibant la croissance de *S. cerevisiae*. Cependant, certaines non-*Saccharomyces* dont *T. delbrueckii* sont sensibles à cet antibiotique. Chaque expérience réalisée avec une souche de *T. delbrueckii* nécessite donc une expérience préliminaire pour définir précisément la concentration de cycloheximide à utiliser et ainsi permettre, d'une part, la croissance de la souche de *T. delbrueckii* et, d'autre part, l'inhibition de la souche de *S. cerevisiae*. Une fois la concentration idéale obtenue, nous avons vérifié que la croissance de *T. delbrueckii* sur milieu YPDA était similaire à celle sur milieu non-*Saccharomyces*. Il est important de noter que bien que le nombre de colonies soit similaire entre les deux milieux, il faut quatre jours pour voir apparaître les colonies sur milieu non-*Saccharomyces* et seulement deux sur milieu YPDA.

V Contrôle d'implantation

Des contrôles d'implantation ont été réalisés lors des expériences de co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* pour vérifier la présence, en fin de fermentation, de l'espèce *T. delbrueckii* (PCR-RFLP des régions ITS) et de la souche de *S. cerevisiae* utilisée (PCR-inter *DELTA*). Par ailleurs, il est important de signaler que la confirmation de la présence d'une levure en fin de fermentation ne veut pas forcément dire qu'elle est encore en activité.

Le contrôle d'implantation se fait par prélèvement d'un millilitre de milieu de fermentation centrifugé (centrifugeuse Sigma 3-16K) à 6000 rpm, pendant 5 minutes à 4°C, puis rincé avec de l'eau Milli-Q (Milipore) stérile, vortexé et de nouveau centrifugé (6000 rpm, 5 minutes, 4°C). L'extraction d'ADN est alors réalisée à partir du culot cellulaire ainsi obtenu.

1 Extraction d'ADN : clone saver card

Pour obtenir une PCR (Polymerase Chain Reaction) de qualité, il est nécessaire d'extraire et de purifier l'ADN contenu dans les échantillons à analyser. Nous avons utilisé pour cela la carte FTA® CloneSaver™ (Whatman®BioScience, USA) qui permet un traitement rapide et facile d'un grand nombre d'échantillons (96 échantillons par carte) ainsi que leur conservation à long terme et à température ambiante.

Le culot cellulaire à analyser est repris dans 500 µL d'eau (1 mL si culot important) et 6 µL de la solution ainsi obtenue sont déposés sur la carte FTA® CloneSaver™ (matrice en papier spécialement traitée) qui est mise à sécher à l'air libre pendant 1h. Une fois l'opération de séchage terminée, l'échantillon imprégné dans la carte peut être conservé ou utilisé pour l'extraction d'ADN. Pour cela, un punch (une pastille) d'échantillon est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Micro-Punch™ 1,2mm) et placé dans un tube PCR. Le punch est ensuite traité par addition de 100 µL de solution FTA® Purification reagent pendant 5 minutes sous légère agitation. Après avoir enlevé le surnageant, le même traitement est effectué, puis après avoir enlevé de nouveau le surnageant, le punch est rincé avec 100 µL d'eau sans agitation pendant 5 minutes. Après avoir retiré l'eau du tube PCR, le punch contenant l'échantillon est prêt pour la PCR.

2 PCR

2.1 PCR-RFLP des régions ITS

Chaque contrôle d'implantation a nécessité la réalisation d'une PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) codant pour l'ARN ribosomal selon la méthode décrite par Granchi *et al.* (1999). Cette PCR permet de différencier facilement la présence d'une culture pure de *T. delbrueckii* et de *S. cerevisiae* ou d'un mélange des deux espèces après électrophorèse sur gel d'agarose.

Les amorces utilisées sont les suivantes : ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Amplification :

30 µL de mélange réactionnel sont préparés par échantillon.

Pour un échantillon le milieu réactionnel comprend :

- de l'amorce ITS 1 : 0,6 µL;
- de l'amorce ITS 4 : 0,6 µL;
- du mixe PCR commercial (MP Biomedicals, USA) (contenant Taq-polymérase + dNTP) : 2,4 µL ;
- de l'eau : 25,4 µl ;
- et le punch (échantillon).

Un thermocycleur (I-cycler, Biorad) a été utilisé pour l'amplification. Le programme est constitué d'un cycle de dénaturation de l'ADN (95°C pendant 6 min), de 28 cycles (94°C pendant 20 sec, 53°C pendant 20 sec et 72°C pendant 1 min) et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 5 min.

Restriction par *ECOR1*:

Une fois la PCR terminée, 8 µL d'ADN amplifié sont prélevés et transférés dans un nouveau tube PCR. Puis 7 µL de mix de restriction sont ajoutés.

Le mix de restriction est composé par échantillon :

- de l'enzyme de restriction *ECOR1* (Biolabs): 0,3 µL;
- du tampon *ECOR1* (Biolabs): 1,5 µL;
- et de l'eau : 6,2 µL.

L'échantillon est alors digéré pendant 2h à 37°C puis 10 min à 70°C (inactivation de l'enzyme de restriction).

2.2 PCR-inter*DELTA*

La PCR inter δ permet d'identifier les souches de *S. cerevisiae* et de pouvoir ainsi différencier les souches commerciales utilisées des souches indigènes.

La technique est basée sur l'amplification de séquences d'ADN génomiques comprises entre les éléments répétés δ (Amorces δ 12: 5'TCAACAATGGAATCCCAAC3' et δ 21 5'CATCTTAACACCGTATATGA3') (Legras et Karst, 2003). L'amplification des régions inter δ est réalisée à partir du mélange réactionnel de 30 µL décrit pour la PCR-RFLP des régions ITS mais avec utilisation des amorces δ décrites ci-dessus. Le même thermocycleur a été utilisé pour l'amplification. Le programme est constitué d'un cycle de dénaturation de

l'ADN (95°C pendant 5 min), de 35 cycles (95°C pendant 15 sec, 55°C pendant 45 sec et 72°C pendant 1 min 30 s) et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 4 min. Cette PCR ne nécessite pas d'étape de restriction.

3 Migration sur gel et interprétation

Ensuite, l'ADN est séparé en fonction de sa taille par électrophorèse (Apelex ST 304) en gel d'agarose. La concentration du gel est de 1,8 % d'agarose dissout dans du tampon TBE (acide borique 0,09 M, EDTA 2mM, Tris pH=8 0,09 M). La migration est effectuée dans le même tampon TBE sous un voltage entre 90 et 110 V. Après migration, le gel est coloré pendant 20 minutes dans du tampon TBE avec 0,7 µg/mL de bromure d'éthidium (BET), puis décoloré pendant 30 minutes dans de l'eau. Le gel est ensuite visualisé sous UV (302 nm), grâce à la fluorescence du BET, et photographié grâce à un appareil photo numérique (Panasonic, DMC-FS7 10M Pixels).

Pour la PCR ITS, l'ADN amplifié avec et sans restriction de chaque échantillon subit la migration sur gel. Selon Granchi *et al.* (1999), la taille du fragment amplifié sans restriction est de 850 paires de bases pour *S. cerevisiae* et 803 pour *T. delbrueckii*. Avec restriction par *ECOR1*, on obtient deux fragments donnant deux bandes sur gel pour *S. cerevisiae* (470 et 360 paires de bases) et deux fragments de même taille ne donnant qu'une seule bande sur gel pour *T. delbrueckii* (2 fois 400 paires de bases). L'illustration de l'interprétation est présentée sur la figure 13.

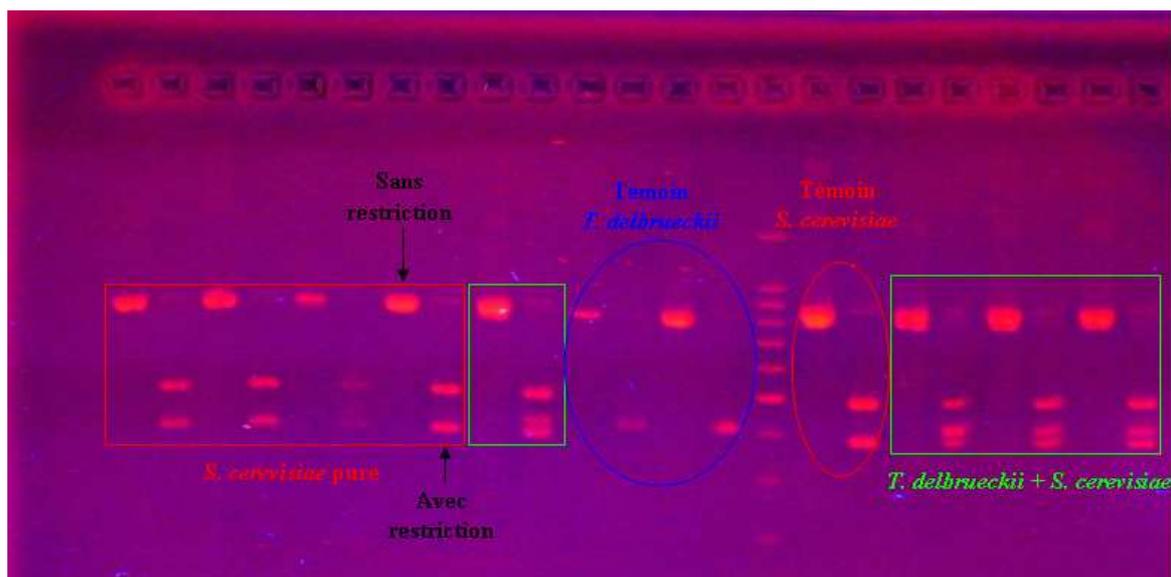


Figure 13 : Interprétation des profils obtenus par migration sur gel d'agarose après PCR-RFLP des régions ITS de *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* et de mélanges *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae*.

La migration sur gel après amplification des régions inter δ donne un profil différent selon les souches de *S. cerevisiae* (Ness *et al.*, 1993).

VI Caractérisation génétique des souches de *T. delbrueckii*

La PCR-RFLP des régions ITS, décrite ci-dessus, permet de différencier l'espèce *T. delbrueckii* de l'espèce *S. cerevisiae* mais ne permet pas de différencier les souches de *T. delbrueckii* entre elles. Ce chapitre décrit quelques méthodes couramment utilisées pour différencier les levures non-*Saccharomyces* au niveau de la souche mais jamais utilisée pour l'espèce *T. delbrueckii*. L'application et la comparaison de ces différentes méthodes sur l'espèce *T. delbrueckii* feront l'objet d'un chapitre (Chapitre I, partie Résultats et Discussion) de cette thèse.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Cécile Miot-Sertier de l'équipe microbiologie de l'UMR 1219, INRA, ISVV (Villenave d'Ornon, France).

1 Extraction d'ADN

Les souches sont cultivées pendant 3 jours à 24°C dans 10 ml d'YPD liquide, puis les cultures sont centrifugées à 5000 g pendant 10 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec du tampon TE (10 mmol/L Tris-HCL, 1 mmol/L EDTA pH8). Les acides nucléiques sont alors extraits selon le protocole décrit par Cocolin *et al.* (2000) et quantifiés en utilisant un spectrophotomètre Biorad SmartSpecTM (Marnes la Coquette, France).

2 Conditions des PCR

L'ADN extrait des souches de *T. delbrueckii* est soumis à plusieurs PCR : 5 PCR-RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) à partir de 5 amorces différentes : M13, M14, Coc, OPA02 et OPA09 (Yu *et al.*, 1997 ; Zapparoli *et al.*, 2000) et 2 PCR fingerprinting utilisant les amorces microsatellites (GTG)₅ et (GAC)₅ (Baleiras Couto *et al.*, 1996) (tableau 6).

Tableau 6 : Présentation des conditions des différentes PCR utilisées.

Type de PCR	Amorces			Cycles PCR			
	Nom	Séquence	Concentration amorces dans mixe réaction	Premier cycle: dénaturation	Cycle	Nombre de cycles	Dernier cycle: extension
RAPD	M13 (Zapparoli et al., 2000)	5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'	2 µmol/L	94°C, 5 min	D: 94°C, 1 min H: 45°C, 1 min E: 72°C, 2 min	40	72°C, 5 min
RAPD	M14 (Zapparoli et al., 2000)	5'-GAGGGTGGGGCCGTT-3'	2 µmol/L	94°C, 5 min	D: 94°C, 1 min H: 45°C, 1 min E: 72°C, 2 min	40	72°C, 5 min
RAPD	Coc (Zapparoli et al., 2000)	5'-AGCAGCGTGG-3'	0.8 µmol/L	94°C, 5 min	D: 94°C, 1 min H: 40°C, 1 min E: 72°C, 2 min	32	72°C, 10 min
RAPD	OPA02 (Yu et al., 1997)	5'-TGCCGAGCTG-3'	4 µmol/L	94°C, 5 min	D: 94°C, 1 min H: 36°C, 1 min E: 72°C, 2 min	39	72°C, 10 min
RAPD	OPA09 (Yu et al., 1997)	5'-GGGTAACGCC-3'	4 µmol/L	94°C, 5 min	D: 94°C, 1 min H: 36°C, 1 min E: 72°C, 2 min	39	72°C, 10 min
Fingerprinting avec amorces microsatellites	(GTG)5 (Baleiras Couto et al., 1996)	(GTG)5	0.2 µmol/L	95°C, 5 min	D: 95°C, 15 sec H: 55°C, 45 sec E: 72°C, 1.5 min	35	72°C, 4 min
Fingerprinting avec amorces microsatellites	(GAC)5 (Baleiras Couto et al., 1996)	(GAC)5	0.2 µmol/L	95°C, 5 min	D: 95°C, 15 sec H: 45°C, 45 sec E: 72°C, 1.5 min	35	72°C, 4 min

D : dénaturation, H : hybridation ; E : élongation

Les réactions sont réalisées dans un volume final de 25 µL pour les PCR-RAPD et 50 µL pour les PCR Fingerprinting, contenant 10 mmol/L Tris-HCL, 50 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L MgCl₂, 0,1% Triton X100, 0,2 mg/mL BSA, 3,12% Glycérol, 0,2 mmol/L de chaque dNTP, 2,5U Taq-Polymérase (Q-BIOgene, Montreal, Canada) et les amorces. Un thermocycleur Biorad est utilisé pour l'amplification. Après amplification, 10 µL des produits PCR sont analysés sur gel d'agarose à 3% (Eurobio, Les Ulis, France) dans du tampon Tris-acétate EDTA 1X (40 mmol/L Tris-acétate, 1mmol/L EDTA pH8) à 110 V pendant 1,5 h.

3 REA-PFGE (Restriction Endonuclease Analysis-Pulse Field Gel Electrophoresis)

Les échantillons de *T. delbrueckii* sont préparés par croissance des souches dans 2 mL de milieu YPD liquide avec agitation pendant 3 jours à 24°C. Les « plugs » sont préparés selon le protocole décrit pour *Brettanomyces bruxellensis* par Miot-Sertier et Lonvaud-Funel (2007). Un demi plug de chaque souche est digéré avec 3 enzymes de restriction différentes (*Sfi I*, *Apa I* et *Not I*), selon les instructions du fabricant (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). L'ADN chromosomique digéré est séparé par électrophorèse en champ pulsé avec système Chef-DR III[®] (Biorad). L'électrophorèse est réalisée à 10°C dans un gel d'agarose à 1% (Pulse Field Certified Agarose, Biorad) dans un tampon TBE 0,5X (0,1 mol/L

Tris, 0,09 mol/L acide borique, 0,01 mol/L EDTA pH8) à 6V/cm : temps de pulsations : 70s pendant 15h et 120s pendant 11 h. Les chromosomes de *S. cerevisiae* YNN295 (Biorad) de tailles connues sont utilisés comme standards.

4 Analyse du profil électrophorétique et estimation de la relation génétique entre les souches

Les gels d'agarose sont colorés pendant 10 minutes sous agitation dans du tampon TAE 1X ou TBE 1X contenant 0,7 µg/mL de bromure d'éthidium puis décolorés à l'eau pendant 2 à 3 h. Les gels sont révélés sous UV à 302 nm et photographiés par un Transilluminateur Infinity 1000 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) pour l'analyse des profils électrophorétiques. Les distances génétiques entre les profils sont déterminées selon la matrice présence/absence des fragments et selon la fraction de fragments partagés (F_{xy}) en utilisant le modèle DICE (Nei et Li 1979) défini comme $F_{xy}=1-(2n_{xy}/(n_x+n_y))$, où n_{xy} est le nombre de fragments partagés par 2 profils x et y, et n_x et n_y sont les fragments observés dans les profils x et y respectivement. Cette matrice de distances génétiques est obtenue en utilisant le logiciel Bio-1D (Vilber Lourmat).

VII Analyse des produits de la fermentation

1 Analyses courantes (sucres, éthanol, acidité volatile, dioxyde de soufre)

Les analyses courantes ont été réalisées par le laboratoire SARCO, laboratoire accrédité COFRAC (comité français d'accréditation) depuis 1995 (programme 78, accréditation N°1-0588 portée disponible sur www.cofrac.fr).

- Le titre alcoométrique volumique (TAV % vol) est mesuré par transflexion dans le proche infra rouge (1000 à 2700 nm) (Spectra Alyser, Axflow, France). La transflexion réunit deux techniques d'analyse : la transmission et la réflexion. Pour le dosage de l'alcool, quatre longueurs d'onde sont utilisées et donc sélectionnées par 4 filtres.

- L'acidité volatile (AV) est constituée par la partie des acides gras appartenant à la série acétique qui se trouve dans les vins soit à l'état libre, soit à l'état salifié. Les acides concernés sont principalement l'acide acétique mais aussi les acides formique, propionique et butyrique. L'acidité volatile est déterminée chimiquement après distillation par une méthode colorimétrique (absorption à 460 nm) à l'aide d'un appareil à flux continu (Sanimat,

Montauban, France) et exprimée en g/L d'H₂SO₄. L'AV étant composée à 95% d'acide acétique, nous transformerons les valeurs exprimées en g/L d'H₂SO₄ en g/L d'acide acétique.

- Le dosage des sucres réducteurs résiduels est réalisé par colorimétrie en flux continu (Sanimat, Montauban, France).

- Le dosage du dioxyde de soufre total et libre est également réalisé par colorimétrie en flux continu (Sanimat, Montauban, France). On appelle dioxyde de soufre total l'ensemble des différentes formes de dioxyde de soufre présentes dans le vin à l'état libre (H₂SO₃, HSO₃⁻, SO₃²⁻) ou combiné à ses constituants.

2 Azote assimilable (azote α-aminé + azote ammoniacal)

L'azote α-aminé (acides aminés primaires) est dosé selon la méthode colorimétrique à l'orthophthaldialdéhyde décrite par Dukes et Butzke (1998). L'azote ammoniacal est déterminé par méthode enzymatique (R-Biopharm, Roche, Germany).

Ces dosages ont été effectués par le laboratoire SARCO.

3 Glycérol et glucose/fructose

Le glycérol, le glucose et le fructose sont dosés par méthode enzymatique en utilisant les kits enzymatiques suivants : glycérol (R-Biopharm, Germany), glucose/fructose (Bohringer Mannheim, Roche). Le mode opératoire suivi est celui préconisé par le fournisseur.

Ces dosages ont été réalisés au laboratoire SARCO.

4 Esters fermentaires

Le phényl-2-éthanol et les esters fermentaires, c'est à dire les acétates de phényléthanol, d'isoamyle et d'héxyle, et le butyrate, l'hexanoate, l'octanoate et le décanoate d'éthyle, sont dosés selon la méthode décrite par Bertrand *et al.* (1978).

Cette analyse nécessite 50 mL d'échantillon clarifié par centrifugation, auquel est ajouté 1 mL de 3-octanol à 100 mg/L. Les esters sont alors extraits avec un mélange d'éther/hexane.

Les étapes nécessaires à l'extraction, c'est-à-dire l'ajout d'éther/hexane, l'homogénéisation par agitation pendant 5 min et la séparation de la phase organique dans une ampoule, sont répétées trois fois. Ensuite, les molécules sont analysées par un chromatographe VARIAN CP3800, équipé d'une colonne capillaire VARIAN CP Wax 57 CB (60 m x 0,25 mm x 0,40 μm) et couplé à un détecteur FID.

Le dosage des esters a été fait par le laboratoire SARCO.

5 Thiols volatils

Le dosage des thiols volatils 4MSP (4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one), 3SH (3-sulfanylhexan-1-ol) et A3SH (acétate de 3-sulfanylhexyl), est effectué, au laboratoire SARCO, sur 50 mL de milieu selon la méthode mise au point par Tominaga *et al.* (2000) et modifiée par le laboratoire. Après extraction, les échantillons sont injectés dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (Hewlett-Packard 5890-II). L'analyse en chromatographie est effectuée avec une colonne BP20 (SGE, 60 m x 0,25 mm, 0,25 µm).

6 Composés volatils majeurs

Une autre méthode de dosage des composés volatils a été utilisée pour caractériser le profil aromatique de différentes souches de *T. delbrueckii* sur milieu synthétique (Chapitre II.2.5, partie Résultats et Discussion), en collaboration avec l'Université de Saragosse (Espagne) qui a réalisé ces analyses. Cette méthode s'appuie sur le protocole proposé par Ortega *et al* (2001). Elle permet, à partir d'un échantillon de 3 mL de doser :

- Acéaldéhyde, acétoïne, diacétyl et γ -butyrolactone ;
- Les alcools supérieurs suivants : isobutanol, alcool isoamylique, phényl-2-éthanol, 1-butanol, 2,3-butanediol et alcool benzylique ;
- Les esters suivants : acétate d'isoamyle, succinate de diéthyle, les lactate, 3-hydroxybutyrate, butyrate, hexanoate et octanoate d'éthyle, et l'acétate de phényléthyle ;
- Et les acides gras suivants : acides butyrique, isobutyrique, hexanoïque, octanoïque, décanoïque et isovalérique.

Après extraction au dichlorométhane, les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe Hewlett-Packard 5890 series II (Avondale, PA), avec un détecteur FID et équipé d'une colonne DB-Wax (50 m x 0.32 mm x 0.5 µm) (J&W, Folsom, CA) et d'une pré-colonne 2 m x 0.53 mm.

Les composés purs, utilisés pour l'analyse quantitative des composés volatils, proviennent de différents distributeurs : Aldrich (Gillingham, U.K.), Sigma (St. Louis, MO), Fluka (Buchs, Switzerland), Poly Sciences (Niles, IL), Lancaster (Strasbourg, France), et Chemservice (West Chester, PA).

7 Thiamine

Le dosage de la thiamine (vitamine B1) a été réalisé au laboratoire Aqualan (Laboratoire Aquitaine Analyses, Pessac, France) par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) avec dérivation post-colonne en thiochrome et détection par fluorescence, selon le principe de la norme NF EN 14122.

Pour doser la thiamine libre, 10 µl d'échantillon (milieu synthétique en fermentation), après centrifugation à 6000 rpm pendant 5 minutes pour éliminer les levures en suspension, sont directement injectés dans le système CLHP puis amenés par la phase mobile dans une colonne : C18 (4.6 mm*150 mm, 5µm). Pour obtenir le thiochrome fluorescent, la thiamine (molécule non fluorescente) est alors oxydée à l'aide d'une réaction post-colonne utilisant une solution d'hexacyanoferrate III de potassium alcalinisée par une solution d'hydroxyde de potassium. Cette solution est ajoutée en continu à l'éluant de CLHP par un tube de raccordement en T et permet la dérivation de l'échantillon dans un réacteur composé d'un tube en téflon d'une longueur de 3 mètres et d'un diamètre interne de 0.8 mm (CIL – 1520XL) « tressé ». Le réacteur est protégé de la lumière par une feuille de papier d'aluminium car la thiamine est photosensible.

La thiamine est dosée par un fluorimètre (longueur d'onde d'excitation = 366 nm, longueur d'onde d'émission = 435 nm), avec la méthode de l'étalonnage externe, c'est-à-dire en intégrant les aires de pic (ou en déterminant les hauteurs de pic) de l'échantillon et en les comparant aux valeurs correspondantes obtenues pour la substance étalon.

VIII Autres protocoles

1 Activité « killer »

Les souches de *T. delbrueckii* sont typées pour le caractère killer, neutre ou sensible vis-à-vis de la toxine killer K2. En effet, le groupe d'activité K2 est, de très loin, le plus largement répandu chez les souches de *S. cerevisiae* rencontrées dans le vin.

Deux souches de *S. cerevisiae* sont utilisées comme contrôle : la souche killer CLIB 154 qui synthétise la toxine killer K2 et la souche X2180 qui est sensible à cette toxine.

Pour cela, un milieu YPDA classique est complété avec du bleu de méthylène (0,003%) et tamponné à pH 4,6 (milieu MB). Le principe consiste à inoculer 10⁶ cellules sensibles en nappe sur le milieu MB puis à faire une strie avec la culture de cellules killer en phase

exponentielle, à la surface de ce tapis cellulaire. L'activité killer est détectée après 2 jours par l'inhibition de croissance de la souche sensible autour de la souche killer, c'est-à-dire une zone claire entourée de halos colorés (figure 14) (Ceccato-Antonini *et al.*, 1999 ; Young 1987).

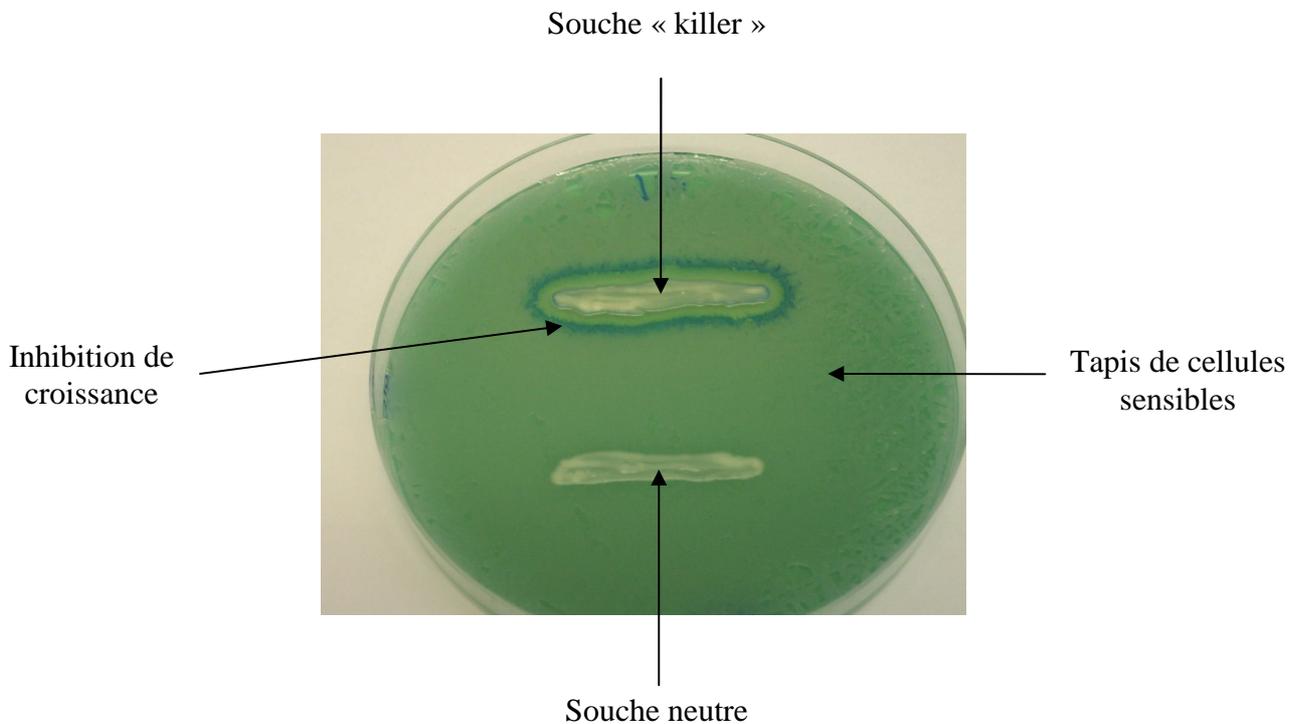


Figure 14 : Test d'activité « killer » sur milieu MB.

Dans un premier temps, le caractère killer des *T. delbrueckii* a été évalué. Pour cela, la souche *S. cerevisiae* sensible X2180 a été étalée à la surface du milieu MB et les différentes souches de *T. delbrueckii* ont été striées à la surface du tapis cellulaire. Inversement, pour évaluer le caractère sensible des *T. delbrueckii*, les différentes souches sont étalées à la surface du milieu MB et la souche killer *S. cerevisiae* CLIB 154 est striée sur le tapis cellulaire.

Sont considérées comme neutres les souches de *T. delbrueckii* qui ne produisent pas la toxine killer K2 et qui ne sont pas inhibées par cette toxine.

2 Test de croissance

La croissance de différentes souches de *T. delbrueckii* à trois températures (10, 26 et 37°C) a été évaluée selon la méthode mise au point par Antunovics *et al.* (2005).

La croissance est évaluée par la mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre UV/visible (Lambda EZ 201, Perkin Elmer) à 590 nm.

Les tests sont réalisés sur un milieu riche (YPD liquide), tout comme les pré-cultures de 24h à 24°C. Chaque souche est inoculée à 0,1 DO dans 10 mL de milieu YPD liquide en tube à essai agités à 150 rpm.

La croissance des souches est évaluée par la mesure de la DO à 590 nm après une durée de 72h à 10°C, 24h à 26°C et 10h à 37°C. La croissance de chaque souche est évaluée par le rapport des densités optiques mesurées en fin et début de croissance : $\Delta DO = DO_{590f} / DO_{590i}$.

3 Production de sulfure d'hydrogène

La production de sulfure d'hydrogène (H₂S) des souches de levure est évaluée sur milieu BIGGY Agar (Difco). Il est obtenu en dissolvant 45g/L de milieu BIGGY agar commercial dans de l'eau chaude.

Cette méthode a été utilisée dans de nombreux travaux pour révéler la capacité de souches *S. cerevisiae* à produire du sulfure d'hydrogène (Jiranek *et al.*, 1995 ; Marullo *et al.*, 2004 ; Rupela et Tauro, 1984). Le milieu BIGGY Agar contient des ions bismuth qui réagissent avec H₂S en formant un précipité brun, l'intensité de la coloration est étroitement corrélée à la quantité d'H₂S produit (Jiranek *et al.*, 1995). Les différentes souches à tester sont striées sur une boîte de Pétri contenant le milieu de caractérisation, ainsi que des souches témoins connues pour leur faible ou forte production d'H₂S. L'évaluation de l'intensité de coloration brune est effectuée après 3 jours de culture à 24°C, selon une échelle visuelle allant de 1 (faible production) à 5 (forte production).

Les tests ont été réalisés en duplicata.

4 Production de phénols volatils

La production de phénols volatils (4-vinyl-phenol, 4-vinyl-gaïacol, 4-ethyl-phenol et 4-ethyl-gaïacol) a été évaluée selon la méthode mise au point par Chatonnet *et al.* (1993). Elle consiste à cultiver les levures dans 10 mL d'YPD liquide supplémenté avec deux précurseurs des phénols volatils, l'acide férulique (1mg/L) et l'acide paracoumarique (1mg/L) pendant 48h sans agitation. La production des différentes souches de *T. delbrueckii* a été comparée à celle de deux *S. cerevisiae*, une souche POF+ (témoin positif) et une souche POF- (témoin négatif).

Après 48h, les échantillons sont centrifugés et les phénols volatils sont extraits, identifiés et quantifiés selon la méthode SBSE/GC/MS décrite par Franc *et al.* (2009) (SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction).

L'analyse est effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse TRACE GC/MS Thermo Finnigan sur lequel sont adaptés plusieurs modules Gerstel :

- un passeur MPS2 (MultiPurposeSampler) ;
- un système de désorption ;
- un système de cryogénéisation ;
- et un système pneumatique assurant le réglage des pressions.

Les modules Gerstel sont commandés par le logiciel Gerstel Master qui assure le pilotage du robot et le réglage des différents paramètres de pression, temps et température.

Le Trace GC/MS est piloté par le logiciel Xcalibur, qui permet de paramétrer les conditions analytiques et chromatographiques.

Le dosage des phénols volatils a été réalisé par le laboratoire Sarco.

5 Extraction glycérol interne

5.1 Détermination du poids sec du culot cellulaire

Pour doser efficacement le glycérol à l'intérieur des levures, il est nécessaire de travailler sur un culot cellulaire correspondant à environ 80 mg d'extrait sec. La quantité d'extrait sec dépend du volume de prélèvement, de la concentration en levures de la solution et de la souche étudiée.

Dans une première étape, nous avons donc recherché la correspondance entre la concentration cellulaire (cellules/mL) et la matière sèche (g/L) pour chaque souche utilisée afin de connaître les volumes de prélèvement à réaliser au cours de l'expérience. Pour cela, 30 mL de milieu sont filtrés sur membrane de nitrate de cellulose (0,45µm) qui est placée dans une coupelle aluminium et mise au four pendant 24h à 100°C. Le poids sec est alors déterminé en soustrayant le poids de la capsule contenant la membrane de filtration avant mise au four par celui de cette même capsule après les 24h à 100°C.

5.2 Extraction du glycérol interne

Nous avons mis au point un protocole d'extraction du glycérol interne en modifiant légèrement le protocole pour l'extraction des métabolites internes par lyse cellulaire que nous a fourni le Professeur Michel Rigoulet travaillant à l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaire (IBGC) CNRS UMR 5095 à Bordeaux.

La première étape consiste à centrifuger (centrifugeuse Sigma 3-16K) à 6000 rpm, pendant 5 minutes à 4°C, un volume du milieu en fermentation pour obtenir un culot cellulaire correspondant à un extrait sec de 80 mg de matière sèche. Le volume à prélever est évalué en se rapportant aux gammes de concentration cellulaire en fonction de la matière sèche préalablement établies pour chaque souche. Le culot est ensuite mis en contact avec 4 mL d'un mélange méthanol/tampon HEPES 175 mM (60/40 v/v) à -80°C, ce qui permet de bloquer le métabolisme des levures et d'éviter une fuite du glycérol intracellulaire dans le milieu extérieur (Gonzalez *et al.*, 1997). Le culot, remis en suspension dans le tampon, est alors transféré dans un tube de 5 ml puis centrifugé à 6000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est alors retiré. Il est important de rester à 4°C pendant toute la suite de l'expérience. 500 µL d'acide perchlorique 1M sont alors additionnés au culot qui est transféré dans un tube Fastprep contenant 1g de billes de 0,5 à 0,6 µm de diamètre. Les tubes sont alors agités par l'appareil FastPrepTM FP120 (Bio 101, ST Quentin en Yvelines, France) : 5 cycles de 45s à 6,5 m/s en remettant les tubes dans la glace entre chaque cycle. Après avoir vérifié au microscope (Novex-Holland, B-series, Pays-Bas) l'efficacité de la lyse cellulaire, 500 µL d'acide perchlorique 1M sont ajoutés, puis les tubes sont agités à l'aide d'un vortex et 850 µL de surnageant prélevés après centrifugation à 12000 rpm pendant 5 mn. Le surnageant est alors transféré dans un tube Eppendorf et 40 µl de Thymol Blue et 200 µl de K₂CO₃ (5M) sont ajoutés. Après 15 minutes et une centrifugation à 12000 rpm pendant 2 mn, 900 µl de surnageant sont prélevés et 40 µl de Tris-HCL 2M sont ajoutés. Le pH est ensuite ajusté entre 6,8 et 7, par ajout de 50 µL d'HCl 1M, et les tubes sont congelés à -20°C jusqu'à analyse.

Le dosage du glycérol, contenu dans les extraits cellulaires, est ensuite réalisé au laboratoire SARCO, selon la méthode enzymatique décrite précédemment (Chapitre VII.3, partie Matériels et Méthodes).

IX Analyse statistique

L'analyse statistique non paramétrique permet d'étudier les données issues de nombreuses populations différentes mais de petites tailles (< 30 échantillons), comme c'est le cas dans notre étude. Ainsi, nous avons utilisé des tests non-paramétriques basés sur l'étude des rangs. Le premier (équivalent non-paramétrique de l'ANOVA à un facteur) est appelé « ANOVA with general scores » ($\alpha < 0,05$) et permet de comparer les souches de *T. delbrueckii* entre elles, le second (équivalent non-paramétrique du test de Student) est appelé « Normal scores » et permet de comparer la population *T. delbrueckii* à la population *S. cerevisiae* ($\alpha < 0,05$). Ces deux tests sont réalisés grâce au logiciel Statxact (Cytel studio).

Tous les autres tests ont été réalisés en utilisant le logiciel R-software Rcdmr pack (www.R-project.com). Les tests suivants sont des tests statistiques classiques (paramétriques) et sont réalisés après avoir vérifié la normalité de la distribution par le test de Shapiro-Wilk ($\alpha < 0,05$). Les valeurs d'acidité volatile et de glycérol ont été soumises à une analyse de variance à deux facteurs ($\alpha < 0,05$), tandis que l'étude de la corrélation entre 2 paramètres est évaluée par l'analyse de la régression linéaire (test de Spearman $\alpha < 0,05$).

Le traitement des tests de dégustation triangulaires, réalisés pour comparer 2 types de vins, est fondé sur la loi binomiale (1/3) (Norme NF V09-013).

Résultats et Discussion

Afin d'évaluer le potentiel « œnologique » de l'espèce *Torulaspora delbrueckii*, nous avons réalisé une étude à partir d'une collection d'environ 30 souches. Cependant, le nombre de souches de *T. delbrueckii* disponibles pour effectuer les diverses expériences a évolué au cours des trois années de thèse. En effet, une quinzaine de souches étaient disponibles à l'origine, pour atteindre trente à l'heure actuelle, expliquant le fait que les souches ne sont pas toujours les mêmes selon les expériences. De plus, lors des dernières expériences, nous avons préférentiellement utilisé les souches faisant partie de la collection IOEB dans l'objectif d'en sélectionner certaines dans un but commercial.

La première partie de ce travail a consisté à comparer différentes méthodes de biologie moléculaires, utilisées pour la caractérisation génétique des souches de différentes espèces non-*Saccharomyces*, afin de voir si elles sont applicables à l'identification au niveau souche de l'espèce *T. delbrueckii*. En effet, aucune méthode de typage n'a été proposée, à notre connaissance, pour différencier les souches de cette espèce. Ensuite, dans une deuxième partie, pour caractériser l'espèce *T. delbrueckii* d'un point de vue phénotypique, nous avons repris un grand nombre de tests habituellement réalisés pour la sélection des souches de *S. cerevisiae*, espèce majoritairement commercialisée. *T. delbrueckii* étant caractérisée par une faible production d'acidité volatile, particulièrement en conditions hyperosmotiques, nous nous sommes intéressés, dans une troisième partie, à ses mécanismes de réponse au stress osmotique. Dans une quatrième partie, afin d'évaluer l'intérêt œnologique de cette espèce dans des conditions proches de celles des vinificateurs, nous avons réalisé des co-inoculations avec *S. cerevisiae* dans des moûts naturels avec les souches les plus performantes identifiées lors de la caractérisation phénotypique. Ce travail nous a amené à mettre au point un outil indispensable à l'étude des interactions entre levures : un fermenteur à double compartiment qui sera présenté dans une cinquième et dernière partie.

I Identification génétique des souches de *T. delbrueckii*

Afin de pouvoir différencier les souches de *T. delbrueckii*, nous avons évalué plusieurs méthodes utilisées au laboratoire pour la caractérisation génétique des souches de diverses espèces de levures non-*Saccharomyces* mais jamais utilisées, à notre connaissance, pour la différenciation des souches de l'espèce *T. delbrueckii*. Ce travail a été réalisé avec Cécile Miot-Sertier (ISVV).

Deux approches techniques ont été utilisées : la PCR et la REA-PFGE. Les résultats obtenus pour 21 souches de *T. delbrueckii* testées sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Profils génétiques obtenus par PCR RAPD, PCR Fingerprinting et REA-PFGE.

Souches	RAPD avec amorces:					PCR fingerprinting avec amorces:		Combinaison des	REA-PFGE
	M13	M14	OPA02	OPA09	Coc	(GAC) ₅	(GTG) ₅	7 profils PCR	Not I
Lm1T10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lm2T7	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lm1T20	3	1	3	3	3	2	3	3	3
GI1	3	3	3	3	3	3	3	4	4
Cbm621	2	1	2	2	2	2	2	5	5
27828	3	3	3	3	3	2	2	6	6
31703	2	2	2	2	3	2	2	7	7
CLIB 230	2	2	2	2	4	2	2	8	8
CLIB 503	2	4	2	2	5	2	2	9	9
CLIB 504	2	2	2	2	3	2	2	10	10
CLIB 505	2	2	2	2	3	2	2	10	10
CLIB 506	4	5	4	2	3	2	2	11	11
CLIB 507	4	5	4	2	3	2	2	11	12
A2	4	5	5	3	6	3	3	12	13
B8	5	5	5	3	6	3	3	13	14
C7	6	6	6	3	6	3	3	14	15
D7	6	6	6	3	6	3	3	14	15
E7	7	5	7	3	7	4	4	15	16
IFR5	8	5	7	3	5	4	4	16	17
IFR7	9	7	7	3	5	4	3	17	18
AN07Y01	7	5	8	3	5	5	3	18	19

Les profils génétiques identiques sont représentés par un numéro identique. Deux souches sont différentes si leurs profils sont différents pour au moins une bande.

L'approche PCR consiste à combiner les résultats obtenus par plusieurs PCR déjà décrites pour l'identification de souches non-*Saccharomyces* (Koscube *et al.*, 2007 ; Pinto *et al.*, 2004). Ainsi, 5 PCR RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) et 2 PCR Fingerprinting avec amorces microsatellites ont été utilisées. L'analyse RAPD permet de diviser les souches en 9, 7, 8, 7 et 3 groupes différents pour les amorces M13, M14, OPA02, Coc et OPA09, respectivement. Les PCR Fingerprinting avec les amorces (GAC)₅ et (GTG)₅, donnent respectivement 5 et 4 groupes différents. La combinaison de ces 7 méthodes PCR permet la séparation des 21 souches en 18 groupes.

La seconde approche est la REA (Restriction Endonuclease Analysis) de l'ADN génomique suivie d'une électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Cette méthode a été utilisée par Miot-Sertier et Lonvaud-Funel (2007) pour le typage au niveau souche de *Brettanomyces bruxellensis*. La REA-PFGE avec les enzymes *Sfi I* et *Apa I* ont généré des profils de restriction très complexes et impossibles à analyser (données non présentées) contrairement à

l'enzyme *Not I* qui a permis d'obtenir des profils analysables (figure 15) permettant la séparation des 21 souches en 19 groupes.

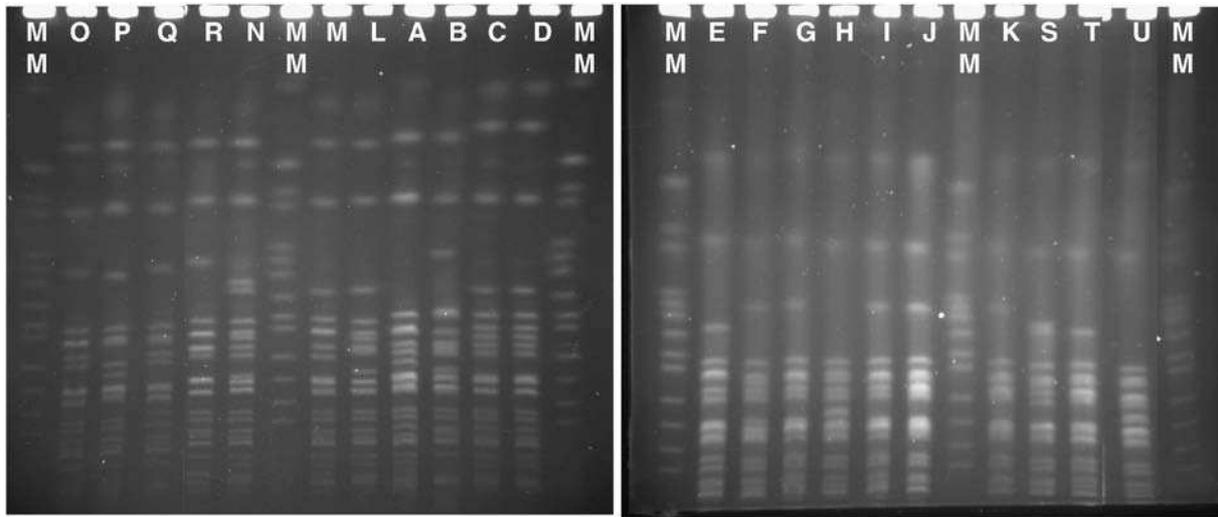


Figure 15 : Profils ADN de 21 souches de *T. delbrueckii* obtenus par REA-PFGE avec *Not I*.

Les souches sont codées de A à U (voir tableau ci-dessous) ; MM représente le standard de taille *S. cerevisiae* YNN295.

Souches	Codes	Souches	Codes
CLIB 230	A	31703	L
CLIB 503	B	27828	M
CLIB 504	C	Cbm621	N
CLIB 505	D	Lm1T10	O
CLIB 506	E	Lm2T7	P
CLIB 507	F	Lm1T20	Q
A2	G	G11	R
B8	H	IFR 5	S
C7	I	IFR 7	T
D7	J	AN07 Y01	U
E7	K		

Aucune des 2 approches n'a cependant permis de différencier génétiquement les souches CLIB 504 et CLIB 505 d'une part et C7 et D7 d'autre part.

La seconde approche, basée sur la REA-PFGE, s'est révélée plus performante et moins contraignante que l'approche combinant 7 PCR différentes, puisqu'elle permet en une seule expérience la différenciation de 19 souches de *T. delbrueckii* sur les 21 testées, soit 90 % des souches, contre 18 pour la combinaison des PCR, soit 85% des souches.

II Caractérisation phénotypique de l'espèce *T. delbrueckii*

Afin de caractériser l'espèce *T. delbrueckii*, nous avons, dans un premier temps, mis en place diverses expériences comprenant des tests sur milieux gélosés et sur milieux spécifiques, puis nous avons évalué leurs caractéristiques fermentaires sur milieux synthétiques mimant la composition d'un moût blanc. L'utilisation de milieux synthétiques nous a paru indispensable pour pouvoir comparer les fermentations entre elles sur une période de trois ans. Plusieurs souches de *S. cerevisiae* ont, par ailleurs, été utilisées comme témoin pour faciliter l'interprétation des résultats obtenus pour l'espèce *T. delbrueckii*.

Pour l'analyse statistique des données, nous avons utilisé le test de Spearman ($\alpha < 0,05$) pour l'étude de la corrélation entre 2 paramètres. Des tests non-paramétriques basés sur l'étude des rangs ont également été utilisés : le premier (équivalent non-paramétrique de l'ANOVA à un facteur) est appelé « ANOVA with general scores » ($\alpha < 0,05$) et permet de comparer les souches de *T. delbrueckii* entre elles, le second (équivalent non-paramétrique du test de Student) est appelé « Normal scores » et permet de comparer la population *T. delbrueckii* à la population *S. cerevisiae* ($\alpha < 0,05$).

1 Tests spécifiques

1.1 Activité killer

Parmi les toxines killer produites par l'espèce *S. cerevisiae*, le groupe K2 est le plus largement représenté dans les conditions œnologiques (Young, 1987). Le but de cette expérience est donc d'évaluer le caractère killer K2 de l'espèce *T. delbrueckii* afin de voir si la croissance de cette espèce est « compatible » avec celle de l'espèce *S. cerevisiae*. En effet, bien que le véritable rôle des toxines killer au cours de la fermentation alcoolique soit discuté (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004), il est indispensable de prendre ce facteur en compte pour réaliser des co-inoculations entre ces 2 espèces.

Les 17 souches testées au cours de cette expérience sont toutes résistantes à la levure killer *S. cerevisiae* (CLIB 154, toxine killer K2) mais incapables de tuer la levure *S. cerevisiae* sensible (X2180, sensible à la toxine killer K2). Elles sont donc considérées comme neutres vis-à-vis de la toxine killer K2.

Ces résultats sont en accord avec Heard et Fleet (1987) qui ont aussi décrit une souche de *T. delbrueckii* comme étant neutre vis-à-vis de cette toxine. Par ailleurs, nous n'avons testé

qu'une des nombreuses toxines potentiellement produites. D'autres essais pourraient être menés afin de connaître la sensibilité de *T. delbrueckii* aux autres toxines produites par les levures *Saccharomyces* mais aussi non-*Saccharomyces*. En effet, des travaux ont révélé la sensibilité de *T. delbrueckii* à l'activité killer de certaines souches appartenant aux genres *Pichia* et *Kluyveromyces* (Yap *et al.*, 2000).

1.2 Production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est un composé soufré indésirable dans le vin car il donne des arômes d'œuf cuit et a un seuil de perception très faible : 10 à 100 µg/L selon les vins (Lambrecht et Pretorius 2000). Sa production peut être sensiblement augmentée lors de la fermentation de moût pauvre en azote.

La production de sulfure d'H₂S a été évaluée pour 27 souches de *T. delbrueckii* en utilisant le milieu Biggy agar. Ce milieu contient des ions bismuth qui réagissent avec H₂S en formant un précipité brun qui rend possible l'évaluation visuelle de la production d'H₂S par la coloration des colonies. En effet, l'intensité de la coloration est étroitement corrélée à la quantité d'H₂S produite (liée à l'activité sulfite réductase des levures) donc plus les colonies sont foncées plus elles ont produit d'H₂S (Jiranek *et al.*, 1995).

Dans ces conditions, les 27 souches de *T. delbrueckii* testées présentent une production modérée et similaire d'H₂S de niveau 3 sur l'échelle visuelle Biggy (allant de 1 à 5) exceptée la souche IFR5 qui présente une production de niveau 4. Dans les mêmes conditions, Jiranek *et al.* (1995) ont trouvé une plus grande variabilité au sein de l'espèce *S. cerevisiae* en utilisant 19 souches classées de faibles à fortes productrices.

1.3 Production de phénols volatils

Certaines espèces de levure sont associées à la production de composés à défaut olfactif : les phénols volatils. Ils sont formés à partir des acides phénoliques contenus dans le vin. Ainsi, une première enzyme, la cinnamate décarboxylase, permet la transformation de l'acide paracoumarique en 4-vinyl-phénol (gouache, caoutchouc brûlé) et de l'acide férullique en 4-vinyl-gaïacol (clou de girofle, amande grillée). Ces deux composés sont cependant peu odorants. Les composés les plus désagréables sont le 4-éthyl-phénol (cuir, écurie, encre) et le 4-éthyl-gaïacol (épice, caramel brûlé). Ils sont formés respectivement à partir du 4-vinyl-phénol et du 4-vinyl-gaïacol par l'intermédiaire d'une enzyme que l'on retrouve principalement chez les

espèces du genre *Brettanomyces* (*Dekkera*), la vinyl-phénol réductase (Chatonnet *et al.*, 1992, 1995).

Dans cette expérience, 28 souches de *T. delbrueckii* ont été testées en duplicata pour leur production de phénols volatils, représentée par la somme du 4-vinyl-phénol, 4-vinyl-gaïacol, 4-éthyl-phénol et 4-éthyl-gaïacol. Cette production a été comparée à celle de deux souches de *S. cerevisiae* : VL1, une souche faiblement productrice (Chatonnet *et al.*, 1993) et ST une souche productrice.

Dans nos conditions, le témoin positif *S. cerevisiae* ST a produit $27 \pm 4,9$ mg/L de phénols volatils alors que la production par le témoin négatif *S. cerevisiae* VL1 est environ dix fois inférieure soit $2,6 \pm 0,1$ mg/L. Les souches de *T. delbrueckii* ont produit de très faibles quantités de phénols volatils dont aucune production d'éthyl-phénol (4-éthyl-phénol et 4-éthyl-gaïacol). Les concentrations varient entre 0,1 et 2,9 mg/L selon les souches (variabilité intraspécifique), avec une production moyenne de $2,1 \pm 0,8$ mg/L (figure 16) inférieure à la souche VL1 considérée comme une faible productrice. Seules 6 souches ont une production légèrement supérieure à celle de VL1 (de 4,5 à 11% de plus). Cependant, la production des différentes *T. delbrueckii* est toujours très inférieure à celle du témoin positif : de 9 à 270 fois moins.

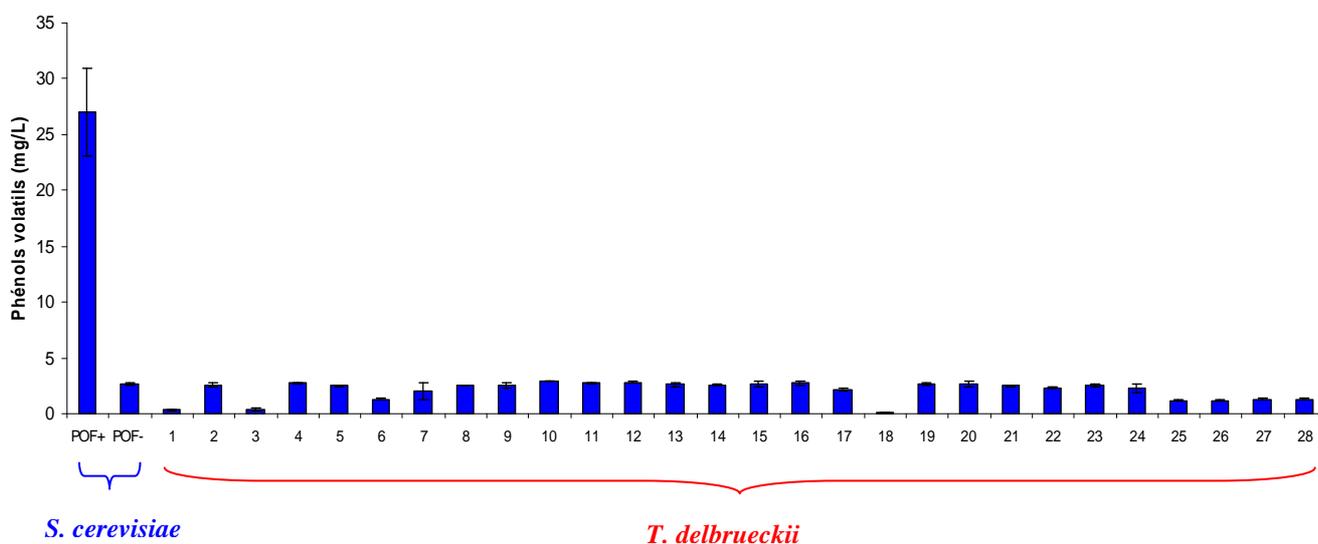


Figure 16 : Concentrations en phénols volatils pour 28 souches de *T. delbrueckii* et 2 *S. cerevisiae* (VL1 : POF- et ST : POF+). Moyenne de 2 répétitions.

Les 28 souches de *T. delbrueckii* sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Codes	Souches	Codes	Souches
1	CLIB 503	15	OXT1 2//3
2	CLIB 504	16	OXT5 6//3
3	CLIB 505	17	POM J2
4	CLIB 506	18	G11
5	CLIB 507	19	A2
6	CLIB 230	20	B8
7	31703	21	C7
8	27828	22	D7
9	CBm621	23	E7
10	Lm1T10	24	7013
11	Lm1T20	25	IFR 5
12	Lm2T7	26	IFR 7
13	OXT1 1//2	27	AN04 Y01
14	OXT1 18//33	28	AN07 Y01

Toutes les souches de *T. delbrueckii* présentent donc une très faible production de phénols volatils relative à une faible activité cinnamate décarboxylase, permettant la transformation des acides phénoliques en vinyl-phénols, et une absence d'activité vinyl-phénol réductase conduisant à la formation d'éthyl-phénol (molécules à défauts olfactif très désagréables). Ces résultats sont en accord avec Shinohara *et al.* (2000) qui ont décrit une souche de cette espèce comme une faible productrice de phénols volatils.

1.4 Croissance à différentes températures

La capacité des levures à se développer est un facteur très important pour réaliser la fermentation alcoolique dans de bonnes conditions.

La croissance de 18 souches de *T. delbrueckii* à trois températures différentes a été évaluée selon la méthode mise au point par Antunovics *et al.* (2005) légèrement modifiée. Les tests sont réalisés sur un milieu YPD liquide inoculé à 0,1 de DO mesurée à 590 nm, à partir des pré-cultures de 24h à 24°C réalisées sur le même milieu. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la DO à 590 nm après une durée de 72h à 10°C, 24h à 26°C et 10h à 37°C. Deux souches de *S. cerevisiae* ont également été testées. Les résultats sont rapportés sur la figure 17 et correspondent au rapport DO₅₉₀ finale/DO₅₉₀ initiale.

A 10°C après 72h, on observe une variabilité intraspécifique importante au sein de l'espèce *T. delbrueckii* avec des rapports compris entre 8,7 et 48,1 (différences significatives). L'augmentation moyenne de la densité optique de $23,2 \pm 9,9$, est légèrement supérieure à la valeur moyenne obtenue pour les deux souches de *S. cerevisiae* soit $19,7 \pm 0,5$ mais n'est pas significativement différente entre les 2 espèces.

La distribution du paramètre croissance est encore plus grande à 26°C (différences significatives entre souches), avec un minimum de 12,9 et un maximum de 62,8 selon les souches. L'augmentation de la croissance moyenne pour l'espèce *T. delbrueckii*, $39,2 \pm 9,8$ est significativement plus faible que celle de *S. cerevisiae*, $50,2 \pm 3,9$.

La croissance moyenne après 10h à 37°C est quasiment nulle puisqu'elle est de $1,27 \pm 0,3$ et est significativement inférieure à celle de *S. cerevisiae* $5,4 \pm 1,1$. Les croissances des différentes souches de *T. delbrueckii* varient de 0,9 à 1,8 et présentent, bien que les valeurs soient très faibles, des différences significatives. Ce résultat souligne une thermosensibilité plus importante de l'espèce *T. delbrueckii* par rapport à l'espèce *S. cerevisiae*.

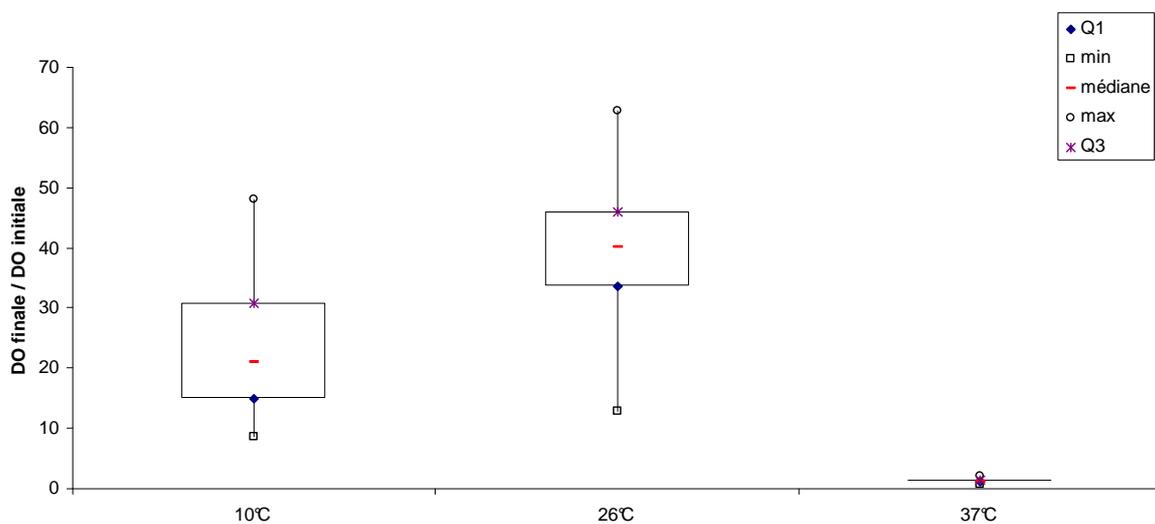


Figure 17 : Augmentation de la densité optique ($D.O_{.590f} / D.O_{.590i}$) à 10°C, 26°C et 37°C pour 16 souches de *T. delbrueckii*.

Finalement, ces résultats nous montrent, d'une part, que l'espèce *T. delbrueckii* présente une variabilité intraspécifique importante au niveau de sa croissance pour les 3 températures différentes et d'autre part que cette espèce est caractérisée par des aptitudes de croissance à 26°C supérieures à celles à 10°C et quasiment nulles à 37°C soulignant sa thermosensibilité. Ces aptitudes de croissance sont similaires à celle de *S. cerevisiae* à 10°C mais inférieures à 26 et 37°C.

2 Propriétés fermentaires

Pour évaluer les capacités fermentaires de l'espèce *T. delbrueckii*, nous avons réalisé plusieurs expériences sur le milieu synthétique (MS) contenant 240 g/L de sucres et 190 mg/L d'azote assimilable. Toutes les fermentations ont été réalisées au laboratoire selon le même protocole, c'est-à-dire à 24°C sous agitation dans des Erlenmeyers de 100 mL inoculés à 2.10^6 cellules viables/mL à partir de pré-cultures de 24h à 24°C. Les fermentations sont réalisées en triplicata. Les valeurs des variables étudiées sont présentées comme la moyenne des 3 répétitions. Certaines expériences ont cependant nécessité de légères modifications de ce protocole qui sont alors mentionnées dans le texte.

2.1 Rendement éthanol/sucres

Pour déterminer le rendement éthanol/sucres, c'est-à-dire la production d'éthanol par gramme de sucres consommés, nous avons utilisé le milieu synthétique MS dont la teneur en sucres a été réduite à 120 g/L (soit environ 7 % vol. éthanol potentiels). Cette concentration faible a été choisie afin que la totalité des sucres soit consommée par les souches *T. delbrueckii*. En effet, à des concentrations en sucres proches de la composition moyenne des moûts (supérieure à 200 g/L), les fermentations seraient languissantes voir incomplètes et pourraient entraîner des erreurs dans le calcul du rendement. En effet, même si ce milieu est un peu éloigné des concentrations en sucres trouvées dans les moûts, il permet la consommation complète des sucres par la majorité des souches de *T. delbrueckii*.

Quatorze souches sur les dix sept testées ont consommé l'intégralité du sucre avec un rendement moyen éthanol/sucres de 0,48g/g. Dans ces conditions, aucune différence significative n'a été observée entre les souches de *T. delbrueckii* et ce rendement est similaire à celui des deux *S. cerevisiae* testées.

2.2 Production d'éthanol

Les levures non-*Saccharomyces*, bien qu'intéressantes de part leurs propriétés spécifiques, ont toutes été décrites pour leurs aptitudes fermentaires limitées (Ciani, 1997 ; Ciani et Maccarelli, 1998 ; Ciani et Picciotti, 1995 ; Jolly *et al.*, 2003 ; Plata *et al.*, 2003 ; Viana *et al.*, 2008). Leur utilisation en culture pure engendre donc dans la majorité des cas des arrêts de fermentation.

Le but de cette expérience est d'évaluer la production maximale d'éthanol de l'espèce *T. delbrueckii* dans un milieu non limitant en sucres. Les fermentations ont donc été réalisées sur milieu synthétique MS (240 g/L de sucres) à deux températures : 17°C qui est une température représentative de la fermentation des vins blancs secs et 24°C qui est une température proche des autres types de vinifications (liquoreux, rosé, rouge) et qui correspond à notre température de fermentation standard au laboratoire. Seize souches ont été testées à 24°C et onze à 17°C.

Dans ces conditions, la production d'éthanol par les différentes souches de *T. delbrueckii* est significativement différente et varie en fonction de la température : à 17°C la production d'éthanol varie de 7,9 à 12,3 % vol. et de 6,3 à 10,9 % vol. à 24°C (figure 18).

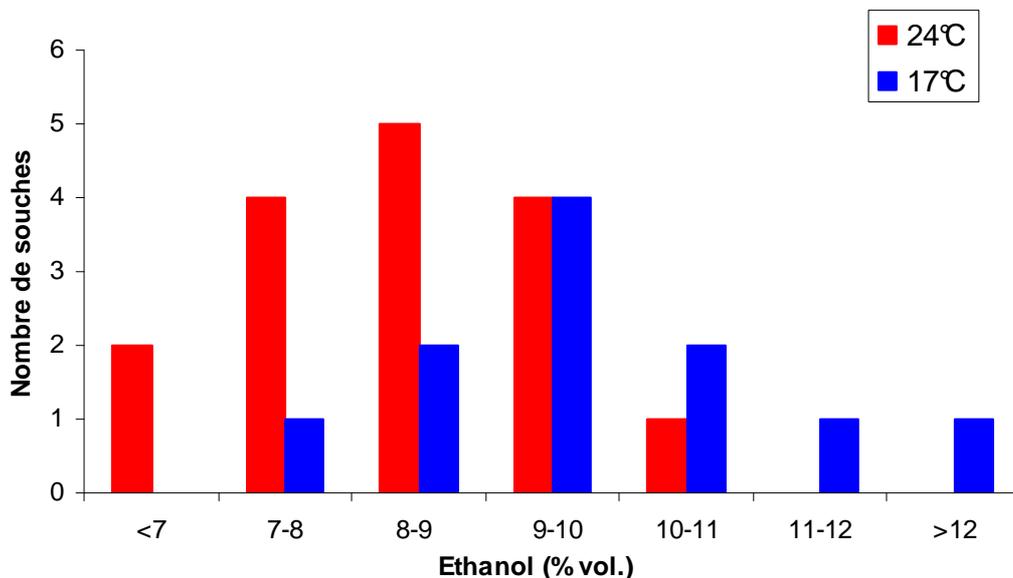


Figure 18. Distribution des souches de *T. delbrueckii* en classe selon leur production d'éthanol à 17°C (n=11) et à 24°C (n=16) sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres.

La valeur moyenne de toutes les souches est supérieure à 17°C : 9,88 % vol. qu'à 24°C : 8,27 % vol. Ce phénomène a déjà été observé chez *S. cerevisiae* où une température basse entraîne une plus forte production d'éthanol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). Bien que la production d'éthanol soit honorable pour cette espèce (jusqu'à 12% vol.), aucune souche n'a été capable d'achever la fermentation alcoolique dans nos conditions expérimentales, confirmant la faible capacité fermentaire de *T. delbrueckii*, déjà observée par certains auteurs (Ciani et Maccarelli, 1998 ; Ciani et Picciotti, 1995).

2.3 Cinétiques de fermentation

Les cinétiques de fermentations, évaluées par la perte de poids engendrée par le dégagement de CO₂ au cours du temps, ont été évaluées pour 16 souches à 24°C et 11 souches à 17°C. Elles sont très différentes selon les souches de *T. delbrueckii* comme l'illustre la figure 19 pour 5 souches à 24 et 17°C.

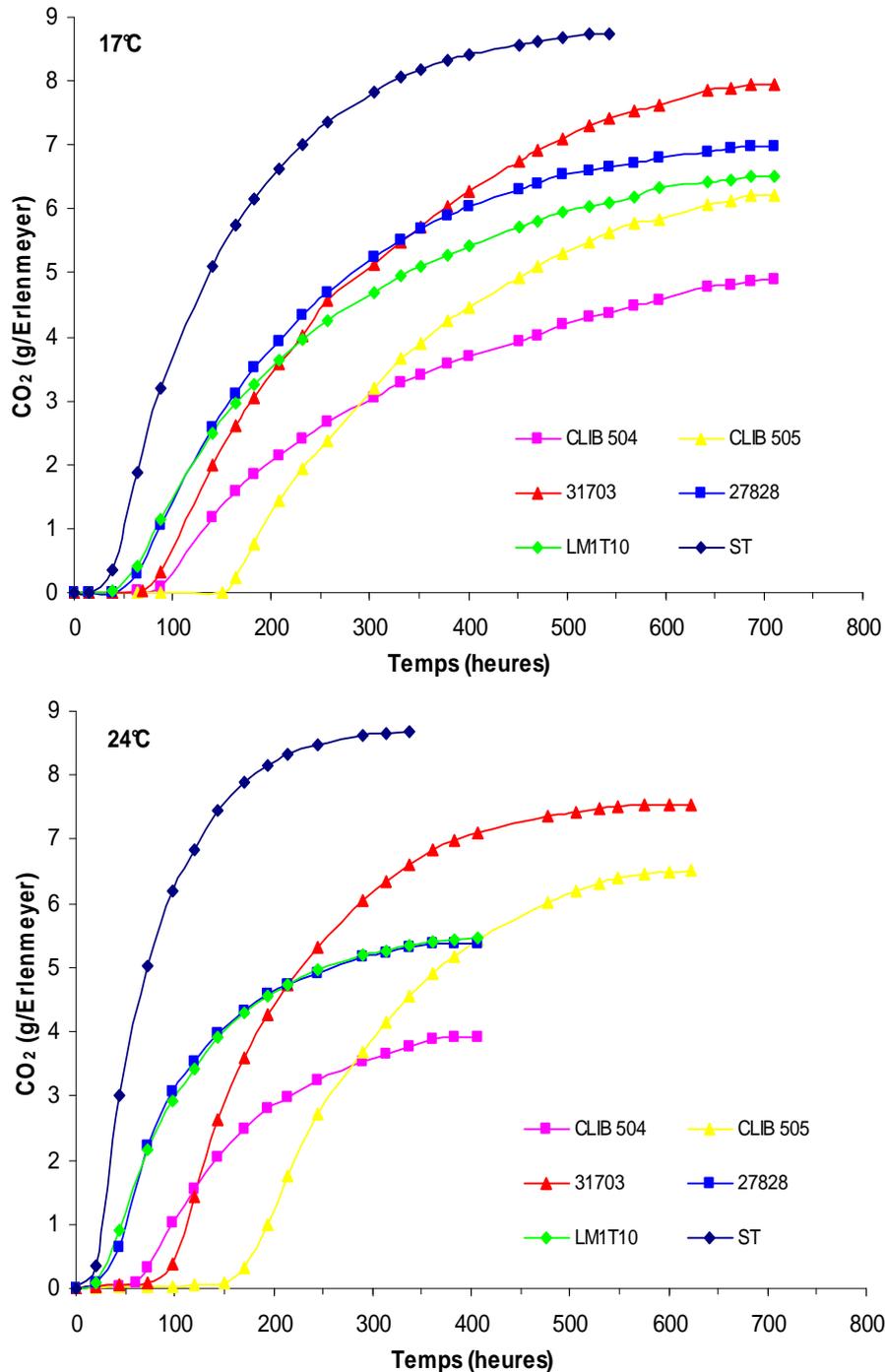


Figure 19. Evolution du dégagement de CO₂ de 5 souches de *T. delbrueckii* (CLIB 504, CLIB 505, 31703, 27828 et LMI10) et 1 souche de *S. cerevisiae* (ST) à 17 et 24°C sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max $\pm 0,2$.

Deux paramètres cinétiques ont été analysés pour comparer la variabilité phénotypique entre les souches : la durée de phase de latence et le T50. La durée de phase de latence correspond au temps entre l'inoculation et le début de dégagement de CO₂ et reflète le temps nécessaire à la levure pour s'adapter au moût. Une phase de latence courte permet d'assurer un bon départ en fermentation, ce qui est un paramètre très important d'un point de vue industriel car la compétition entre levures est importante dans le moût. Dans nos conditions de laboratoire, les durées de phase de latence sont significativement différentes d'une souche à l'autre et varient en fonction de la température. Comme attendu, les durées de phase de latence sont plus courtes à 24°C (20 à 150h) qu'à 17°C (40 à 160) (tableau 8).

Tableau 8 : Paramètres cinétiques : durée de phase de latence et T50 à 17°C et 24°C pour 16 souches de *T. delbrueckii* et 2 souches de *S. cerevisiae* sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres. Moyenne de 3 répétitions. Ecart type max ± 1 pour les durées de phases de latence, ± 10 pour le T50.

Souche	<i>S. cerevisiae</i>							<i>T. delbrueckii</i>											
	ST	SB	CLIB 230	CLIB 504	CLIB 505	CLIB 506	CLIB 507	A2	B8	C7	D7	E7	31703	27828	Cbm621	Lm1T10	Lm1T7	G11	
Phase latence (h)	17°C	28	58	160	75	150	85	50	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	70	75	50	50	65	40
T50 (h)		118	148	300	500	250	150	210	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	180	315	190	230	220	235
Phase latence (h)	24°C	15	20	150	60	160	45	45	20	20	20	20	20	80	45	20	20	20	20
T50 (h)		62	85	250	420	175	350	120	170	165	180	150	155	120	320	185	187	350	190

Nous avons testé dans les mêmes conditions 2 souches de *S. cerevisiae* : la souche ST qui est une souche commerciale caractérisée par une durée de phase de latence relativement courte contrairement à la souche SB qui a une phase un peu plus longue (Marullo *et al.*, 2006). A 17°C les phases de latence pour ces 2 souches sont respectivement de 28 et 58h. Quatre souches de *T. delbrueckii* : CLIB 507, Cbm621, Lm1T10 et G11 ont donc une durée de phase de latence inférieure à la souche *S. cerevisiae* SB, mais aucune à celle de la souche ST. A 24°C, les phases de latence des souches de *S. cerevisiae* ST et SB sont respectivement de 15 et 20h. Comme pour la température de 17°C, aucune souche de *T. delbrueckii* ne présente une durée de phase de latence inférieure à celle de la souche ST mais 9 souches (A2, B8, C7, D7, E7, Cbm621, Lm1T10, Lm2T7 et G11) ont une durée de phase de latence similaire à celle de la souche *S. cerevisiae* SB.

Les souches de *T. delbrueckii* Cbm621, Lm1T10 et G11 ont donc des durées de phase de latence toujours inférieures ou égales à celle de *S. cerevisiae* SB. La souche G11 présente de

plus la durée de phase de latence la plus courte de toutes les souches de *T. delbrueckii* aux deux températures, ce qui représente un avantage pour coloniser le moût.

Le second paramètre cinétique, le T50, correspond au temps requis pour fermenter 50% des sucres initiaux sans prendre en compte la durée de phase de latence. Ce paramètre rend possible la comparaison des fermentations incomplètes. Comme attendu, le T50 est généralement plus court à 24 qu'à 17°C sauf pour les souches CLIB 506 et Lm2T7 qui ont une meilleure capacité à fermenter à basse température (tableau 8). Les valeurs de T50 sont très différentes entre les souches et varient de 150 à 500h à 17°C et de 120 à 420h à 24°C, ce qui illustre la grande variabilité phénotypique au sein de l'espèce *T. delbrueckii*.

Dans les mêmes conditions, les T50 des 2 souches de *S. cerevisiae* ST et SB sont respectivement de 118 et 148h à 17°C et de 62 à 85h à 24°C. Aucune souche de *T. delbrueckii* ne présente de T50 plus court que ceux des 2 *S. cerevisiae*, que ce soit à 17 ou 24°C. L'espèce *T. delbrueckii* est donc caractérisée par une vitesse de fermentation plus faible que l'espèce *S. cerevisiae*.

En conclusion, l'espèce *T. delbrueckii* présente une grande variabilité phénotypique au niveau de ces cinétiques fermentaires, que ce soit au niveau de la durée des phases de latence ou de la vitesse de fermentation estimée par le paramètre T50. Comme pour l'espèce *S. cerevisiae*, les vitesses de fermentation sont globalement plus rapides à 24°C qu'à 17°C. De même les durées de phase de latence sont en général plus courtes à 24°C qu'à 17°C. Si l'on compare les 2 espèces, aucune souche de *T. delbrueckii* ne présente une durée de phase de latence inférieure à la souche commerciale *S. cerevisiae* ST mais 3 souches ont des durées de phase de latence inférieures ou égales à celle de la souche *S. cerevisiae* SB aux 2 températures testées. Cependant, les 2 souches de *S. cerevisiae* ont toujours une vitesse de fermentation (T50 le plus court) supérieure aux souches de *T. delbrueckii*.

2.4 Production d'acidité volatile et de glycérol

Au-delà d'une certaine teneur, environ 0,6 g/L, l'acide acétique joue un rôle négatif sur les qualités organoleptiques des vins (Lambrechts et Pretorius 2000). Le glycérol, a quant à lui, un rôle organoleptique plutôt neutre, même s'il semblerait qu'il agisse sur le volume en bouche (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). Dans les conditions classiques de vinifications, où la teneur en sucres varie entre 220 et 250 g/l, l'espèce *S. cerevisiae* produit peu d'acide acétique. Cependant, dans les conditions extrêmes, c'est-à-dire pour des concentrations en sucres supérieurs à 300 g/L (cas des moûts liquoreux), les levures doivent adapter leur métabolisme

pour résister à ce stress osmotique important. Cette adaptation, chez la levure *S. cerevisiae*, se traduit par une forte production d'acide acétique couplée à une forte production de glycérol induit par le stress osmotique. Ceci s'explique par le fait que *S. cerevisiae* augmente son accumulation de glycérol intracellulaire pour contrebalancer la pression osmotique du milieu, ce qui induit une augmentation de la production d'acide acétique pour équilibrer le potentiel d'oxydo-réduction de la cellule (Blomberg, 2000 ; Blomberg et Adler 1989, 1992 ; Erasmus *et al.*, 2003 ; Hohmann, 2002). Aussi, dans ces conditions extrêmes, une production d'acide acétique importante est inévitable par la levure *S. cerevisiae*. De plus, sa concentration finale est liée à la concentration initiale en sucres du moût et non pas à la quantité de sucres fermentés (Lafon-Lafourcade et Ribéreau-Gayon, 1977).

Dans les analyses courantes des vins, on ne dose pas directement la concentration en acide acétique mais la production d'acidité volatile (AV) qui est composée à 95% d'acide acétique, les 5% restant étant dû à l'accumulation d'autres acides organiques volatils au cours de la vinification. En France, l'AV est exprimée en g/L H₂SO₄. Dans ce travail, les analyses étant toutes faites par un laboratoire œnologique, nous présenterons les AV exprimées en g/L acide acétique pour discuter de la production d'acide acétique. Par ailleurs, la teneur en AV des vins est réglementée par l'OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) et ne doit pas dépasser les 0,9 g/L H₂SO₄ (soit 1,08 g/L acide acétique) dans les vins blancs secs et 1,25 g/L H₂SO₄ (soit 1,5 g/L acide acétique) pour les vins liquoreux. La teneur réglementaire pour les vins liquoreux peut poser des problèmes aux vinificateurs car cette concentration peut être facilement dépassée dans le cas des moûts très sucrés pour les raisons que nous avons évoquées précédemment.

Nous avons ainsi évalué la production d'AV et de glycérol sur trois milieux synthétiques avec des concentrations en sucres différentes (120, 240 et 350 g/L). Quinze souches ont été testées à 120 g/L, 16 à 240 g/L et 18 à 350 g/L. Ces productions ont été systématiquement comparées à celles de deux *S. cerevisiae* : ST, levure faiblement productrice d'AV et couramment utilisée pour l'élaboration de vins liquoreux (Erasmus *et al.*, 2004 ; Masneuf et Dubourdiou, 2000), et SB, levure fortement productrice d'AV (Marullo *et al.*, 2006).

Il existe des différences significatives entre les souches de *T. delbrueckii* pour la production d'AV et de glycérol quelle que soit la teneur en sucres du milieu, ce qui témoigne d'une grande variabilité intraspécifique pour ces paramètres (tableau 9).

Tableau 9 : Production d'acidité volatile (AV) et de glycérol par les espèces *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* à 24°C dans les milieux synthétiques à 120, 240 et 350 g/L de sucres.

		Concentration en sucres initiale			
		120 g/L	240 g/L	350 g/L	
	Acidité volatile (g/L acide acétique)	Valeur minimum	0,01 ±0,01	0,01 ±0,01	0,06 ±0,01
		Valeur maximum	0,61 ±0,02	0,57 ±0,11	1,07 ±0,12
		Valeur moyenne	0,28 ±0,18	0,28 ±0,19	0,37 ±0,30
		Nombre de souches	15	16	18
<i>T. delbrueckii</i>	Glycérol (g/L)	Valeur minimum	2,07 ±0,23	3,3 ±0,10	1,74 ±0,33
		Valeur maximum	4,44 ±0,14	6,03 ±0,38	5,25 ±0,21
		Valeur moyenne	3,16 ±0,72	4,38 ±0,68	3,44 ±1,00
		Nombre de souches	15	16	18
<i>S. cerevisiae</i>	Acidité volatile (g/L acide acétique)	Valeur minimum (souche ST)	0,27 ±0,01	0,20 ±0,07	1,04 ±0,13
		Valeur maximum (souche SB)	0,28 ±0,01	0,70 ±0,04	1,62 ±0,15
		Valeur moyenne	0,27 ±0,01	0,45 ±0,35	1,33 ±0,41
	Glycérol (g/L)	Valeur minimum (souche ST)	2,87 ±0,12	6,57 ±0,35	8,27 ±0,55
		Valeur maximum (souche SB)	4,27 ±0,12	9,47 ±0,21	14,70 ±0,14
		Valeur moyenne	3,57 ±0,99	8,02 ±2,05	11,48 ±4,55

* Indique qu'il y a des différences significatives entre les souches (ANOVA, general scores $P < 0,05$)

Cependant, la différence de production entre les souches de *T. delbrueckii* est plus marquée pour la production d'AV que pour le glycérol. La production moyenne de ces deux composés est similaire pour *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* pour le milieu à faible concentration en sucres (120 g/L) mais inférieure chez *T. delbrueckii* avec les concentrations en sucres plus élevées (240 et 350 g/L). Avec le milieu à 350 g/L de sucres, qui représente un stress osmotique important pour les levures, la grande majorité des souches de *T. delbrueckii* testées a une production d'AV nettement inférieure à celle de *S. cerevisiae* ST, qui est pourtant faiblement productrice. Ce résultat confirme la grande pureté de fermentation de l'espèce *T. delbrueckii* dans les moûts à fortes concentrations en sucres comme décrit dans la littérature (Bely *et al.*, 2008 ; Ciani et Maccarelli, 1998 ; Ciani et Picciotti, 1995). Cependant, quelques souches de *T. delbrueckii* ont des productions d'AV similaires ou parfois supérieures à la souche commerciale *S. cerevisiae* ST : 11 souches à 240 g/L et 2 souches à 350 g/L.

La production d'AV et de glycérol des 13 souches de *T. delbrueckii* et des 2 souches de *S. cerevisiae* ayant été évaluées sur les 3 milieux différents sont représentées sur la figure 20.

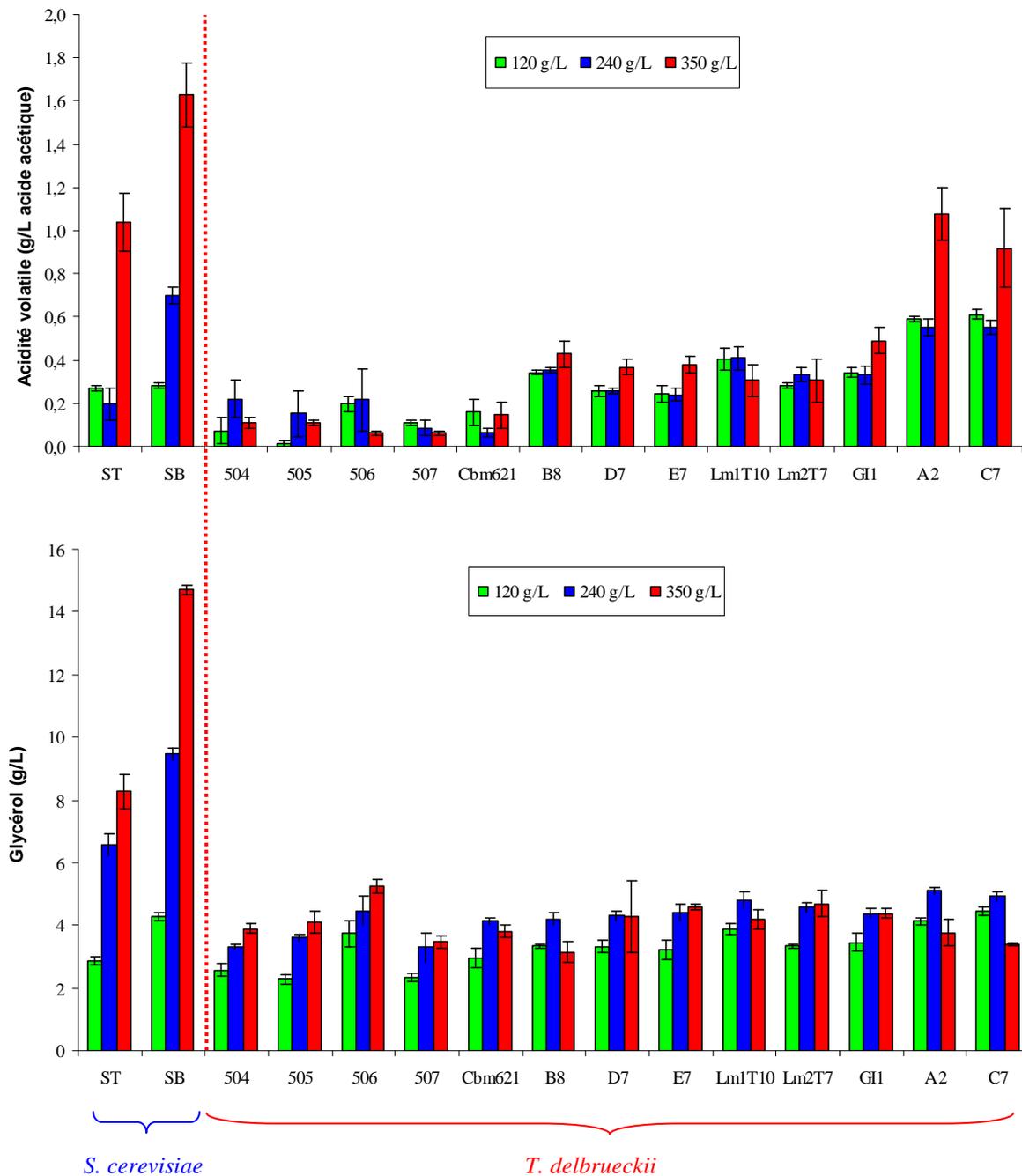


Figure 20 : Production d'acidité volatile et de glycérol sur milieux synthétiques avec 3 concentrations en sucres différentes (120, 240 et 350 g/L) à 24°C pour 13 souches de *T. delbrueckii* et 2 souches de *S. cerevisiae*. Moyenne de 3 répétitions.

Les valeurs obtenues pour l'espèce *T. delbrueckii* ont été analysées par ANOVA à deux facteurs (tableau 10). Le but de cette analyse statistique est de déterminer quelle est l'influence du paramètre « souche » et du paramètre « concentration en sucres du milieu » sur

la production d'AV et de glycérol par l'espèce *T. delbrueckii*. L'effet souche est très significatif et représente 36% de la variation totale pour la production de glycérol et 75% pour la production d'acidité volatile. Le paramètre « concentration en sucres du milieu » influence très peu la production d'acidité volatile (6% de la variation totale) et a moins d'influence que le paramètre « souche » pour la production de glycérol (28% de la variation totale). Ces derniers résultats montrent clairement que *T. delbrueckii* a une réponse au stress osmotique différente de celle de *S. cerevisiae* pour qui l'augmentation de la concentration en sucres se traduit systématiquement par une production importante de glycérol et d'AV (Blomberg et Adler, 1989, 1992 ; Erasmus *et al.*, 2003).

Tableau 10 : Analyse de variance (ANOVA 2 facteurs) sur l'influence de la souche de *T. delbrueckii* et de la concentration initiale en sucres du milieu sur la production d'acidité volatile et de glycérol.

	Acidité volatile	Glycérol
Valeur moyenne (g/L)	0,38	4,45
Total de la somme des carrés	5,67	60,34
Souche	75,27*	35,85*
Sucre	5,74*	28,45*
Interactions souche/sucre	10,72*	25,27*
Résidus	8,27	10,43

P < 0,001 ; * % de la variation totale

La relation entre la production d'acidité volatile et de glycérol pour les trois concentrations en sucres a été évaluée pour l'espèce *T. delbrueckii* par régression linéaire (test de Spearman, P<0,05). Pour les milieux à 120 et 240 g/L de sucres, les productions d'acidité volatile et de glycérol sont significativement corrélées ($p = 0,0001$; $p = 0,0025$) et présentent des coefficients de corrélation de 0,915 et 0,837 respectivement, contrairement au milieu à 350 g/L où il n'y a pas de corrélation significative (coefficient de corrélation = -0,56 ; $p = 0,3984$). Ce phénomène est également différent pour *S. cerevisiae* chez qui, en condition hyperosmotique, la production de glycérol est liée à la production d'acide acétique (Blomberg 2000 ; Blomberg et Adler 1992 ; Erasmus *et al.*, 2003 ; Hohmann, 2002). La réponse au stress osmotique de *T. delbrueckii* fera l'objet d'un prochain chapitre (Chapitre III, partie Résultats et Discussion).

La faible production d'acidité volatile en condition hyperosmotique par l'espèce *T. delbrueckii* est très intéressante, notamment, dans le cas de l'élaboration des vins liquoreux où

il y a une forte production d'AV par les levures *S. cerevisiae* pouvant conduire à un dépassement des teneurs réglementaires. L'utilisation de *T. delbrueckii* en inoculation mixte avec *S. cerevisiae*, dans le but de réduire la production d'AV dans un moût liquoreux, a ainsi été proposée par Bely *et al.* (2008).

2.5 Composés aromatiques

Le métabolisme secondaire des levures entraînent la formation d'une centaine de composés tels que : des alcools supérieurs, des esters, des acides organiques, des aldéhydes, des cétones, des amines ou des composés soufrés volatiles (Lambrechts et Pretorius, 2000 ; Nykanen, 1986; Swiegers *et al.*, 2005). La production de ces composés varie, pour un même moût, en fonction des souches et espèces de levures utilisées.

Pour caractériser le profil aromatique fermentaire de l'espèce *T. delbrueckii*, nous avons dosé divers arômes (esters, alcools supérieurs, acides gras, acétaldéhyde, acétoïne, diacétyl et γ -butyrolactone) selon le protocole proposé par Ortega *et al.* (2001) lors de la fermentation sur milieu synthétique MS.

Douze souches de *T. delbrueckii* ont été évaluées au cours de cette expérience. Comme décrit précédemment, les fermentations réalisées par cette espèce ne sont pas complètes sur ce milieu. En conséquence, pour comparer la production aromatique pour un même avancement de la réaction, les fermentations ont été stoppées et le milieu analysé après consommation de 50% des sucres. Les valeurs moyennes, minimum et maximum, correspondant à la production de chaque composé analysé sont présentées dans le tableau 11.

Toutes les souches de *T. delbrueckii* ont produit de très faibles quantités d'acétaldéhyde (aigre, pomme verte), très inférieures à son seuil de perception dans le vin (100 mg/L) (Lambrechts et Pretorius, 2000) comme l'ont déjà observé divers auteurs (Bely *et al.*, 2008 ; Ciani et Picciotti, 1995 ; Herraiz *et al.*, 1990 ; Lema *et al.*, 1996). Le diacétyl (note beurrée) est une molécule qui a faibles concentrations (< 4 mg/L) améliore la qualité du vin mais qui, à des concentrations plus élevées, a un impact négatif (Rankine *et al.*, 1969). Par ailleurs, la majorité du diacétyl formé au cours de la fermentation alcoolique est réduite en acétoïne (crémeux, lacté) et 2,3-butanediol qui sont des composés beaucoup moins odorants (Postel et Meier, 1983, de Revel *et al.*, 1989). Dans nos conditions, la production de diacétyl par l'espèce *T. delbrueckii* est toujours supérieure à son seuil de perception dans une solution modèle (0,1 mg/L) (Ferreira *et al.*, 2000), mais inférieure à 4 mg/L, concentration à partir de laquelle le diacétyl est considéré comme négatif pour la qualité des vins. La production

d'acétoïne est également très faible, largement en dessous de son seuil de perception dans une solution modèle (150 mg/L) (Ferreira *et al.*, 2000), et est significativement différente selon les souches de *T. delbrueckii*.

Tableau 11 : Teneurs moyennes en composés volatils majeurs produits à 24°C par 12 souches de *T. delbrueckii* sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres.

	Moyenne	Ecart type	Valeur min.	Valeur max.
Acétaldehyde	0,13	0,55	0,00	0,82
Acétoïne*	3,34	1,90	0,96	6,20
Diacétyl	0,71	0,51	0,30	1,19
Alcools supérieurs				
Isobutanol	17,52	4,37	13,81	24,40
Alcool isoamylique*	59,94	12,39	33,68	75,69
Phényl-2-éthanol	24,54	14,78	7,87	45,85
1-butanol*	0,22	0,05	0,17	0,28
2,3-butanediol*	0,93	1,47	0,00	5,03
Alcool benzylique	0,03	0,03	0,00	0,07
Somme	103,18			
Esters				
Acétate d'isoamyle	ND			
Succinate de diéthyle	0,02	0,08	0,00	0,11
Lactate d'éthyle*	3,12	0,04	3,06	3,19
3-hydroxy-butyrat d'éthyle*	0,06	0,03	0,04	0,12
Butyrat d'éthyle	ND			
Hexanoate d'éthyle	ND			
Octanoate d'éthyle	ND			
Acétate de phényléthyle*	0,09	37,25	36,71	138,41
Somme	3,29			
Acide gras				
Acide butyrique	0,17	0,04	0,13	0,20
Acide isobutyrique*	1,55	0,75	0,81	2,61
Acide hexanoique	0,12	0,04	0,09	0,16
Acide octanoique	0,09	0,02	0,06	0,10
Acide décanoique	0,22	0,08	0,16	0,32
Acide isovalérique	0,07	36,36	24,55	105,09
Somme	2,22			
Lactone				
γ-Butyrolactone*	0,16	0,05	0,06	0,22

Les données sont exprimées en mg/L, ND signifie concentration inférieure à la limite de détection ; * veut dire qu'il y a une différence significative entre les souches de *T. delbrueckii* à $P < 0,05$.

La somme des teneurs en alcools supérieurs est un paramètre discutable mais utilisé comme indicateur en œnologie. Elle varie entre 56 et 133 mg/L avec une concentration moyenne de 103 mg/L. Des différences significatives ont été mises en évidence dans la production de certains alcools supérieurs comme l'alcool isoamylique, le 1-butanol et le 2,3-butanediol. Les deux alcools supérieurs produits en plus grande quantité sont l'alcool isoamylique (solvant, banane) et le phényl-2-éthanol (rose) avec une production moyenne respective de 60 et 25 mg/L inférieure au seuil de perception pour l'alcool isoamylique (300 mg/L en solution modèle) (Lambrecht et Pretorius 2000) mais supérieure pour le phényl-2-éthanol (14 mg/L en solution modèle) (Ferreira *et al.*, 2000). Ces résultats sont en accord avec Ciani et Picciotti (1995), Herraiz *et al.* (1990) et Moreno *et al.* (1991) qui ont mis en évidence une production importante de ces 2 alcools supérieurs. Cependant, les teneurs globales en alcools supérieurs obtenues par ces auteurs, en fin de fermentation sur moût, étaient largement supérieures aux nôtres (entre 240 et 485 mg/L).

Les souches de *T. delbrueckii* ont produit de faibles quantités d'esters, entre 3,2 et 3,4 mg/L avec une valeur moyenne de 3,3 mg/L. Comme présenté dans le tableau 11, il n'y a eu aucune production d'acétate d'isoamyle ni de butyrate, hexanoate et octanoate d'éthyle au cours de la fermentation alcoolique, comme déjà observé par Hernandez-Orte *et al.* (2008) dans un milieu synthétique similaire. Des différences significatives entre souches de *T. delbrueckii* ont été révélées pour la production d'acétate de phényléthyle, de lactate d'éthyle et de 3-hydroxybutyrate d'éthyle. Aucun ester n'a été produit en concentration supérieure à son seuil de perception en solution modèle.

La somme des acides gras produits est comprise entre 1,5 et 3,2 mg/L avec une valeur moyenne de 2,2 mg/L. Ces résultats sont en accord avec Hernandez-Orte *et al.* (2008). Il n'y a pas de différence entre souches pour la production des différents acides gras sauf pour l'acide isobutyrique qui est par ailleurs l'acide gras produit en plus grande quantité. Ceci a déjà été constaté sur moût par Herraiz *et al.* (1990) dans des concentrations similaires.

Enfin, la production de γ -butyrolactone (note beurrée) varie considérablement selon les souches mais sa concentration est toujours inférieure au seuil de perception en solution modèle (35 mg/L) (Escudero *et al.*, 2007).

La production d'arômes fermentaires par *T. delbrueckii*, dans nos conditions expérimentales, a été globalement faible si on compare nos résultats à ceux mentionnés dans la littérature. Ce phénomène est peut-être dû à l'arrêt précoce volontaire de la fermentation (à 7% vol. éthanol) et à l'utilisation d'un milieu synthétique. En effet, d'autres auteurs ont également trouvé de

faibles productions d'arômes par diverses espèces (y compris *S. cerevisiae*) dans des milieux synthétiques similaires (Hernandez-Orte *et al.*, 2008 ; Viana *et al.*, 2008).

Pour vérifier si la faible production d'arômes était due en partie à l'utilisation du milieu synthétique, nous avons également évalué la production, par 3 souches de cette expérience, sur un moût de Colombarde comprenant 177 g/L de sucres et ajusté à 200 mg/L d'azote assimilable. Si la production de phényl-2-éthanol a augmenté (52 mg/L au lieu de 25 mg/L sur milieu MS) et est largement supérieure au seuil de perception en solution modèle (14 mg/L), la production des autres composés aromatiques, et notamment des esters, est toujours aussi faible (teneur totale en esters < 3 mg/L) (données non présentées).

En conclusion, aucune molécule odorante produite en grande quantité et pouvant caractériser l'espèce *T. delbrueckii* n'a pu être mise en évidence au cours de notre essai. Seul le phényl-2-éthanol semble être produit à des concentrations supérieures à son seuil de perception. Cet essai a cependant permis d'illustrer la pureté de fermentation de l'espèce *T. delbrueckii* caractérisée par une très faible production de composés à défauts aromatiques comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde et le diacétyl. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs (Ciani et Maccarelli, 1998; Ciani et Picciotti, 1995; Herraiz *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1991).

2.6 Consommation du glucose/fructose

Chez l'espèce *S. cerevisiae*, le fructose est transporté à l'intérieur de la cellule par les transporteurs du glucose car il n'existe pas de transporteur de fructose spécifique (Reifenberg *et al.*, 1997). Alves-Araujo *et al.* (2005) ont, par ailleurs, émis la même hypothèse sur l'espèce *T. delbrueckii*. *S. cerevisiae* est souvent décrite comme une espèce consommant préférentiellement le glucose que le fructose (Berthels *et al.*, 2004). Cette préférence peut être la cause de fermentations languissantes et d'arrêts de fermentation. Ainsi, selon Gafner et Schütz (1996), un rapport de glucose/fructose < 0,1 conduit à un arrêt de fermentation. De nombreuses études ont alors vu le jour pour identifier des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* pouvant facilement consommer le fructose. Des études ont ainsi décrit des capacités de consommation du fructose intéressantes chez certaines espèces de levures non-*Saccharomyces* comme *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Candida stellata* et *Zygosaccharomyces bailii* (Ciani *et al.*, 2000 ; Ciani et Fatichenti, 1999 ; Souza-Dias *et al.*, 1996).

Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'évaluer la consommation du fructose et du glucose de l'espèce *T. delbrueckii* et de la comparer à celle de *S. cerevisiae*.

Pour cela, nous avons suivi dans le temps les concentrations en fructose et glucose de différentes fermentations réalisées par 8 souches de *T. delbrueckii* : 31703, Cbm621, Lm1T10, Lm2T7, Lm1T20, GI1, OXT1 1//2 et OXT1 18//33 et 4 souches de *S. cerevisiae* commerciales : BO213, Fermichamp, X5 et X16. Le milieu de fermentation utilisé (MS) contient des quantités de glucose et fructose identiques. Les fermentations ont été réalisées en triplicata.

Le dosage du fructose et du glucose à 4 et 8% vol. éthanol et en fin de réaction nous a permis de mettre en évidence que la consommation moyenne de fructose et glucose (exprimée en % de la concentration initiale) est similaire (pas de différences significatives) pour les espèces *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* jusqu'à 8% vol. éthanol. En effet, à 4% vol. éthanol, les deux espèces ont consommé des quantités similaires de sucres avec une consommation de glucose légèrement supérieure à celle du fructose soit 30% du glucose total et 24% du fructose pour l'espèce *T. delbrueckii* et 36% du glucose total et 22% du fructose pour *S. cerevisiae* (figure 21). A 8% vol. éthanol, les deux espèces ont consommé préférentiellement le glucose soit 62 et 66% contre seulement 34 et 33% du fructose total pour respectivement *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*. La différence entre les deux espèces apparaît en fin de fermentation avec une consommation complète du glucose et fructose par *S. cerevisiae* et une consommation moyenne pour les 8 souches de *T. delbrueckii* de 85% du glucose et 58% du fructose. Il est important de préciser que les degrés alcooliques atteints par les différentes souches de *T. delbrueckii* ont varié de 9 à 12,2% vol. éthanol et qu'aucune souche n'a consommé l'intégralité des sucres.

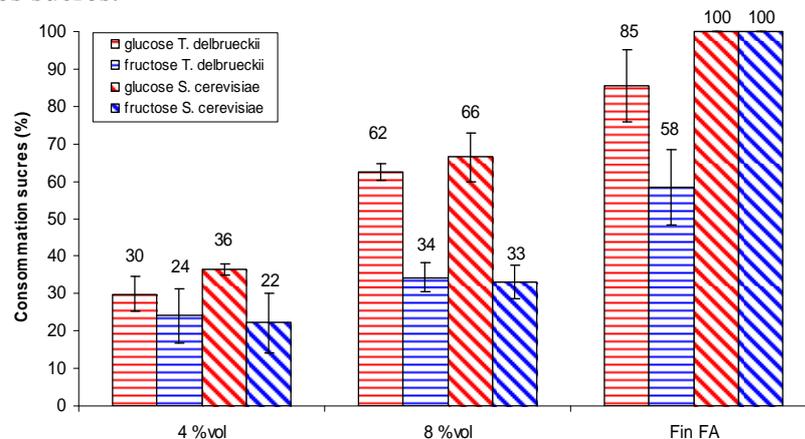


Figure 21 : Consommation moyenne de glucose et fructose de 8 souches de *T. delbrueckii* et de 4 souches de *S. cerevisiae* à 4 et 8 % vol. éthanol et à la fin de la fermentation alcoolique. Les résultats sont exprimés en % de sucres consommés par rapport à la valeur initiale : 120 g/L de glucose et 120 g/L de fructose.

Bien que la consommation moyenne de l'espèce *T. delbrueckii* soit similaire à celle de *S. cerevisiae* jusqu'à 8% vol. éthanol, il y a des différences significatives entre les souches de *T. delbrueckii* sur la quantité de glucose et fructose consommés pour un même degré d'avancement de la réaction. Ainsi, la figure 22 présente les rapports de glucose consommé sur fructose consommé, à 4 et 8% vol. éthanol, pour les 8 souches de *T. delbrueckii* et les 4 souches de *S. cerevisiae*.

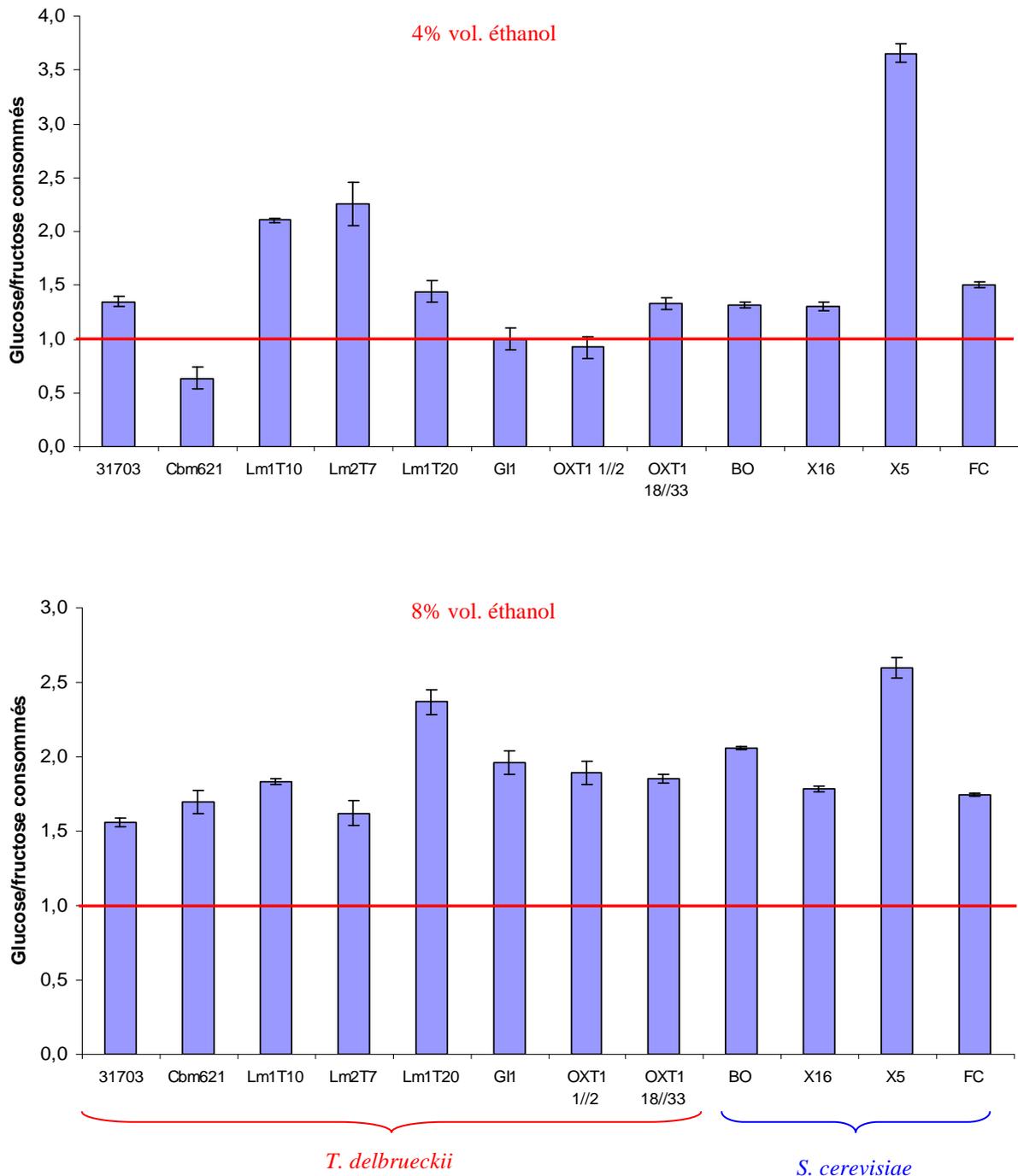


Figure 22 : Rapport glucose consommé / fructose consommé à 4 et 8% vol. éthanol pour 8 souches de *T. delbrueckii* et 4 souches de *S. cerevisiae*. Moyennes de 3 répétitions.

Un rapport supérieur à 1 signifie que la souche a consommé préférentiellement le glucose et un rapport inférieur à 1, préférentiellement le fructose. A 4% vol. éthanol, 2 souches de *T. delbrueckii* : Cbm621 et OXT1 1//2 ont consommé plus de fructose que de glucose et la souche GI1 autant de fructose que de glucose. Les 5 autres souches de *T. delbrueckii* ont consommé plus de glucose que de fructose. Cependant, à 8% vol. éthanol et jusqu'à la fin de la fermentation alcoolique, il y a une consommation préférentielle du glucose (rapport > 1) pour l'ensemble des souches. Dans les mêmes conditions, les souches de *S. cerevisiae* présentent également une variabilité intraspécifique et une consommation préférentielle du glucose.

En conclusion, l'espèce *T. delbrueckii* ne présente pas de consommation particulière du fructose et a un comportement similaire à *S. cerevisiae* jusqu'à 8% vol. éthanol. Nos résultats sont en accord avec Santos *et al.* (2008) qui n'ont pas mis en évidence une consommation importante de fructose par 2 souches de *T. delbrueckii* dans un milieu synthétique simulant un moût en arrêt de fermentation. Selon ces auteurs, les transporteurs de glucose, servant aussi au transport du fructose, de *T. delbrueckii* seraient plus sensibles à l'éthanol que ceux de *S. cerevisiae*.

2.7 Consommation de la thiamine

La thiamine est un facteur de croissance indispensable aux levures car elle est un cofacteur de nombreuses enzymes intervenant dans les réactions du métabolisme (pyruvatedécarboxylase, pyruvatedéhydrogénase). Elle est naturellement présente dans le moût à des concentrations comprises entre 150 et 750 µg/L (Peynaud et Lafourcade, 1977). Les levures sont capables d'en consommer entre 600 et 800 µg/L durant les premières heures de fermentation (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). La teneur en thiamine d'un moût influence la concentration cellulaire et les cinétiques fermentaires. Ainsi, la consommation de la thiamine par les souches indigènes constituant la microflore du moût peut conduire à des fermentations languissantes, voir des arrêts de fermentation. Ceci a été confirmé en laboratoire où la consommation rapide de la thiamine par une souche de l'espèce *Kloeckera apiculata* entraîne une diminution de la croissance de *S. cerevisiae* et une fermentation languissante (Bataillon *et al.*, 1996). L'évaluation de la consommation de la thiamine est donc un facteur important à considérer pour la réalisation d'inoculation mixte.

Le but de cette expérience est d'évaluer la consommation de la thiamine par l'espèce *T. delbrueckii*, c'est-à-dire voir si elle est capable de consommer une grande quantité de thiamine (900 µg/L dans le milieu MS), si les vitesses d'assimilation sont variables selon les souches et si cette consommation est plus précoce que celle de l'azote assimilable.

La consommation de la thiamine par l'espèce *T. delbrueckii* a été évaluée pour 4 souches (OXT1 1//2, OXT1 2//3, OXT5 6//3 et GI1) présentant des capacités biotiques différentes sur milieu synthétique MS, et comparée à celle de 2 *S. cerevisiae* (ST et SB). Dans un souci budgétaire, l'expérience n'a pas été répétée. En effet, les dosages de cette vitamine réalisés par un laboratoire privé étant très onéreux, nous avons privilégié le nombre de souches étudiées plutôt que la répétition de l'expérience.

Trois souches de *T. delbrueckii*, OXT1 1//2, OXT1 2//3 et GI1 ainsi que les 2 souches de *S. cerevisiae* ont intégralement consommé les 900 µg/L contenus dans le milieu initial (figure 23). Dans les mêmes conditions, la souche OXT5 6//3 a consommé 95% de la thiamine initiale. La consommation intégrale de la thiamine est légèrement plus rapide pour l'espèce *S. cerevisiae* que pour l'espèce *T. delbrueckii* : soit 18 à 23h et 27 à 42h respectivement. Cette différence est en partie due à une phase de latence plus courte chez *S. cerevisiae* (entre 19 et 24h) que chez *T. delbrueckii* (entre 28 et 33h) (figure 24) et donc a un début de croissance plus rapide. Bien que la consommation par la souche OXT5 6//3 soit inférieure à celle des autres souches, elle reste relativement importante car plus de 90% de la thiamine est dégradée en 42h. Par ailleurs, il est important de noter que cette souche présente la plus faible vitesse de croissance et la plus faible concentration cellulaire maximale (figure 25).

La consommation totale de la thiamine est très rapide pour ces deux espèces : elle a lieu en début de phase de croissance, c'est-à-dire bien avant l'obtention de leurs populations maximales atteintes entre 48 et 67 h pour les *S. cerevisiae* et 67 et 122h pour les *T. delbrueckii* (figure 23 et 25). A ce stade, quelle que soit la souche et l'espèce, seulement 0,5 g de CO₂ a été dégagé par Erlenmeyer, ce qui correspond à une concentration en éthanol comprise entre 1 et 1,5 % vol. sur les 14% vol. théoriques (données non présentées).

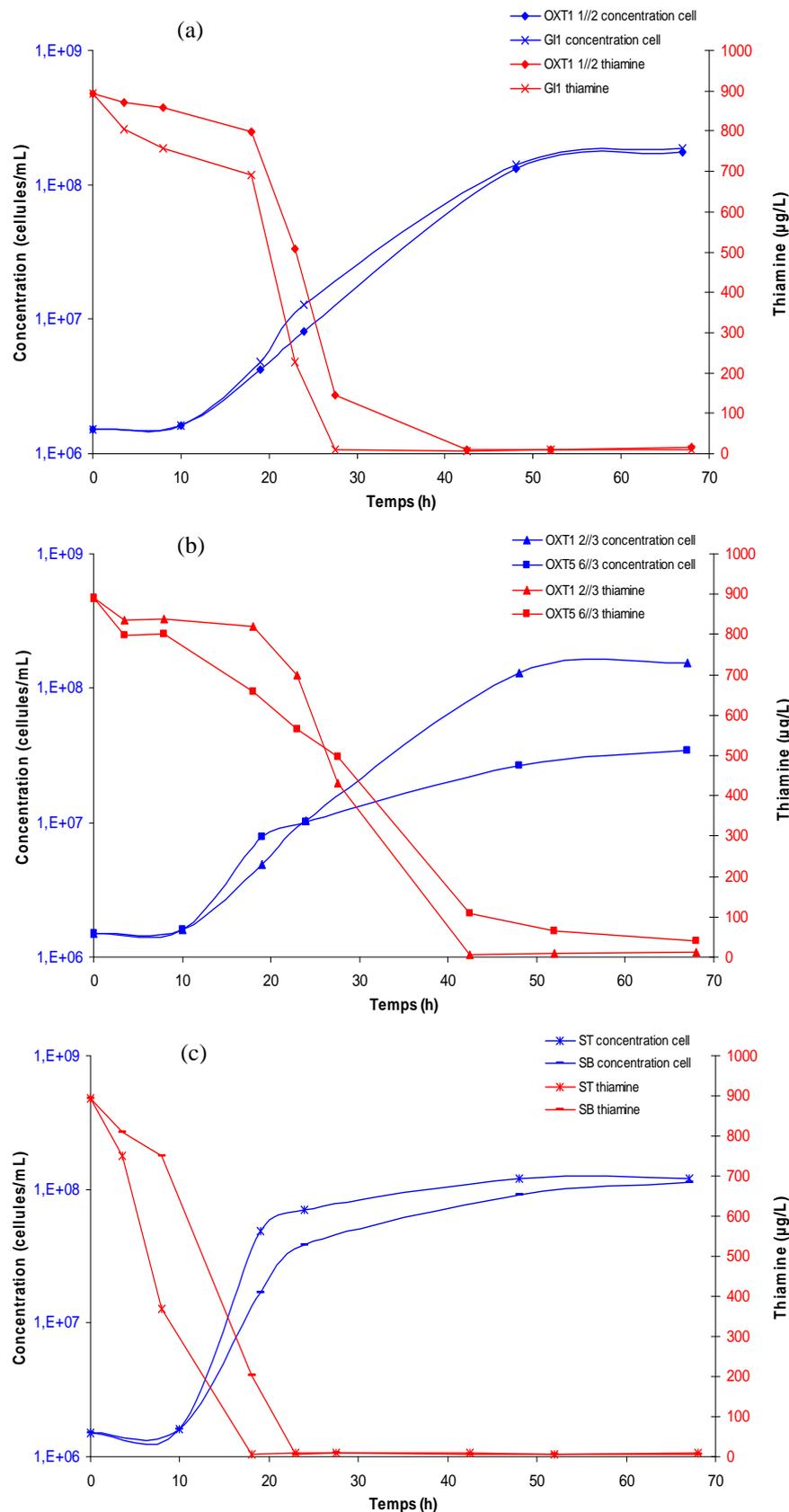


Figure 23 : Evolution de la concentration résiduelle en thiamine et de la concentration cellulaire (représentée sur échelle logarithmique décimale) en fonction du temps pour 4 souches de *T. delbrueckii* : OXT1 1//2 et OXT1 2//3: (a), OXT5 6//3 et GI1: (b) et 2 souches de *S. cerevisiae* : ST et SB (c). Moyennes de 3 répétitions pour la concentration cellulaire avec un écart type max de $\pm 5.10^6$.

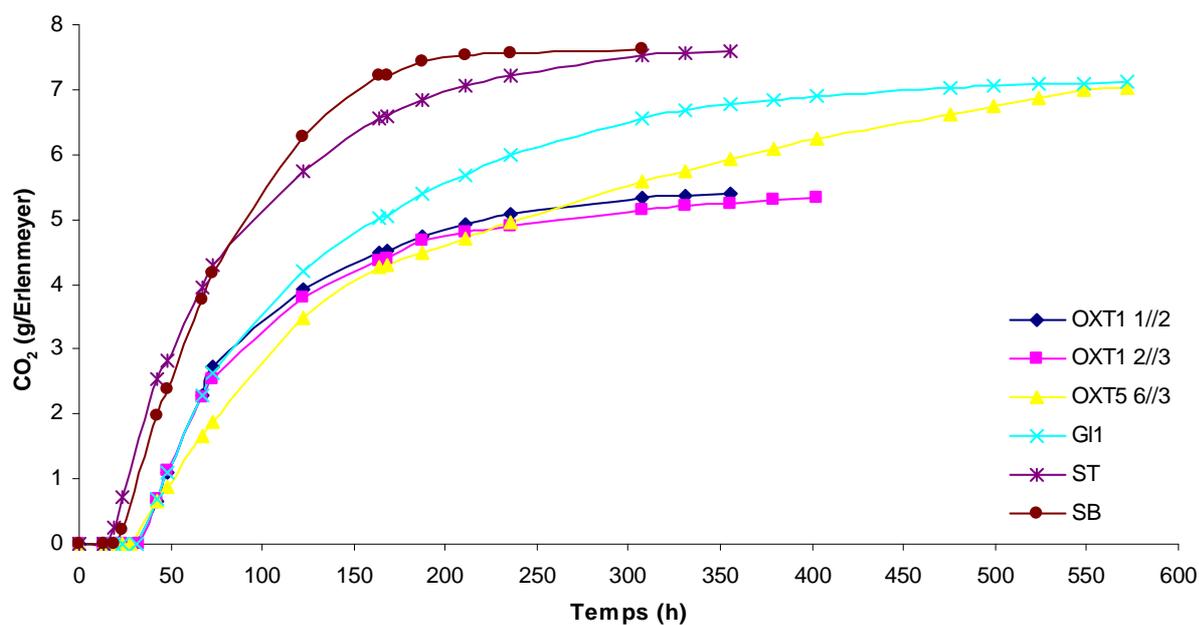


Figure 24 : Evolution du dégagement de CO₂ à 24°C sur milieu synthétique à 240 g/L de sucres pour 4 souches de *T. delbrueckii* (OXT1 1//2, OXT1 2//3, OXT5 6//3 et GI1) et 2 souches de *S. cerevisiae* (ST et SB). Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max $\pm 0,2$.

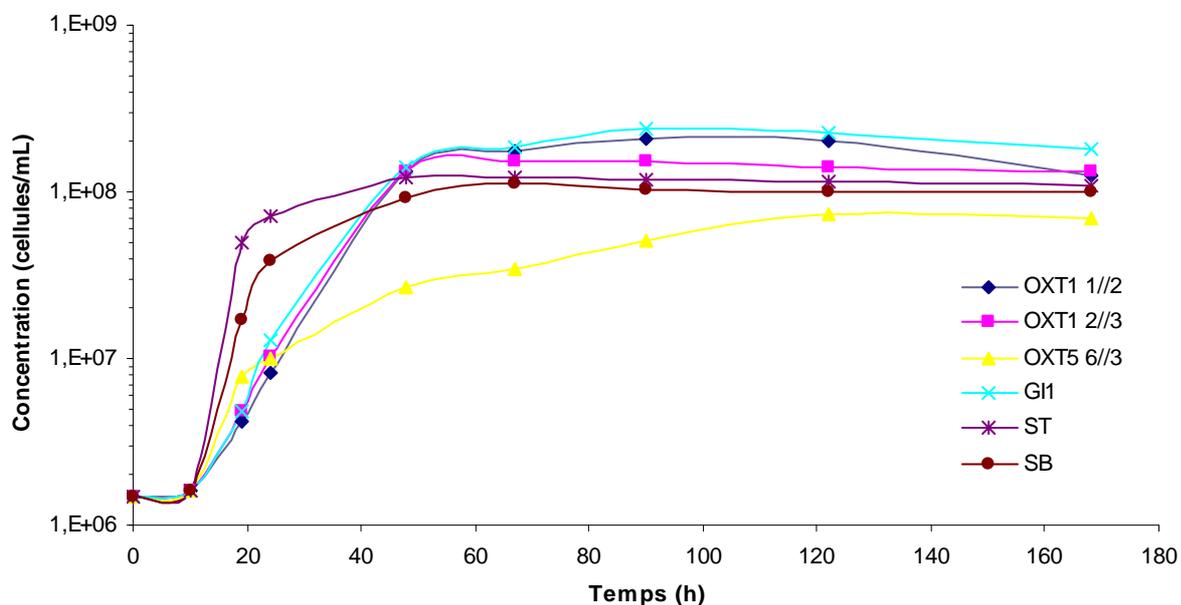


Figure 25 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps pour les 4 souches de *T. delbrueckii* : OXT1 1//2, OXT1 2//3, OXT5 6//3 et GI1 et les 2 souches de *S. cerevisiae* : ST et SB. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max de $\pm 5.10^6$.

La vitesse de consommation maximale, exprimée en $\mu\text{g/L/h}$, a été déterminée graphiquement (mesure de la pente maximale entre 2 prélèvements) pour chaque souche. L'espèce *T. delbrueckii* présente des différences importantes entre ses souches qui varient de 26 à 93 $\mu\text{g/L/h}$, tandis qu'elle est comprise entre 54 et 85 $\mu\text{g/L/h}$ pour les 2 *S. cerevisiae* (figure 26).

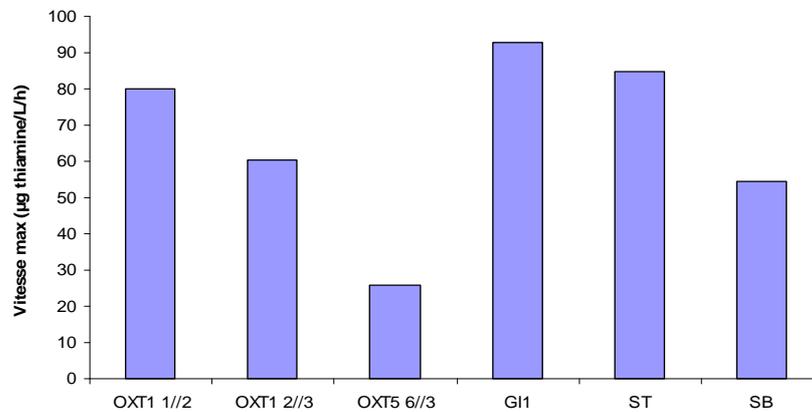


Figure 26 : Vitesses de consommation maximales de la thiamine pour 4 souches de *T. delbrueckii* (OXT1 1//2, OXT1 2//3, OXT5 6//3 et GI1) et 2 souches de *S. cerevisiae* (ST et SB).

Il est intéressant de noter que la vitesse de consommation maximale de la thiamine semble corrélée à la population cellulaire maximale pour l'espèce *T. delbrueckii* ($R^2=0,9942$) (figure 27). Cependant, cette corrélation n'est pas significative, au seuil de risque de 5%, en raison du faible nombre de valeurs mais l'est au seuil de risque de 10% ($p = 0,0833$). Des points supplémentaires permettraient certainement d'établir une corrélation significative. Cette relation ne semble pas valable pour l'espèce *S. cerevisiae* car les deux souches présentent des vitesses de consommation différentes alors qu'elles ont des populations maximales similaires.

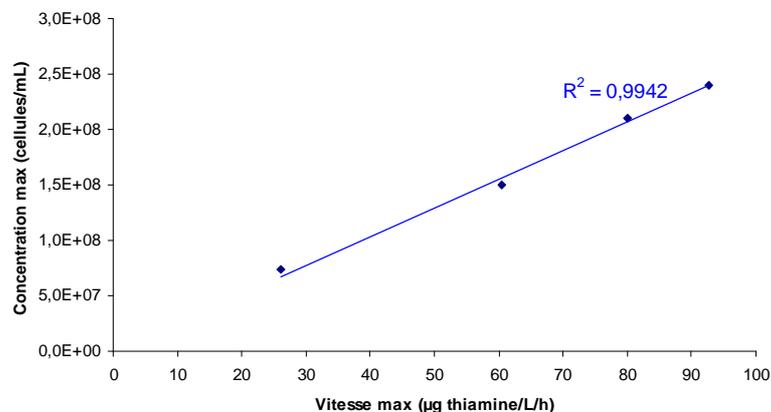


Figure 27 : Corrélation entre concentration cellulaire maximale et vitesse de consommation maximale de la thiamine pour les 4 souches de *T. delbrueckii*.

Par ailleurs, quelle que soit la souche de *T. delbrueckii* ou de *S. cerevisiae*, la consommation de thiamine est plus précoce que celle de l'azote (figure 28). La totalité de l'azote est cependant aussi consommée durant la phase de croissance cellulaire.

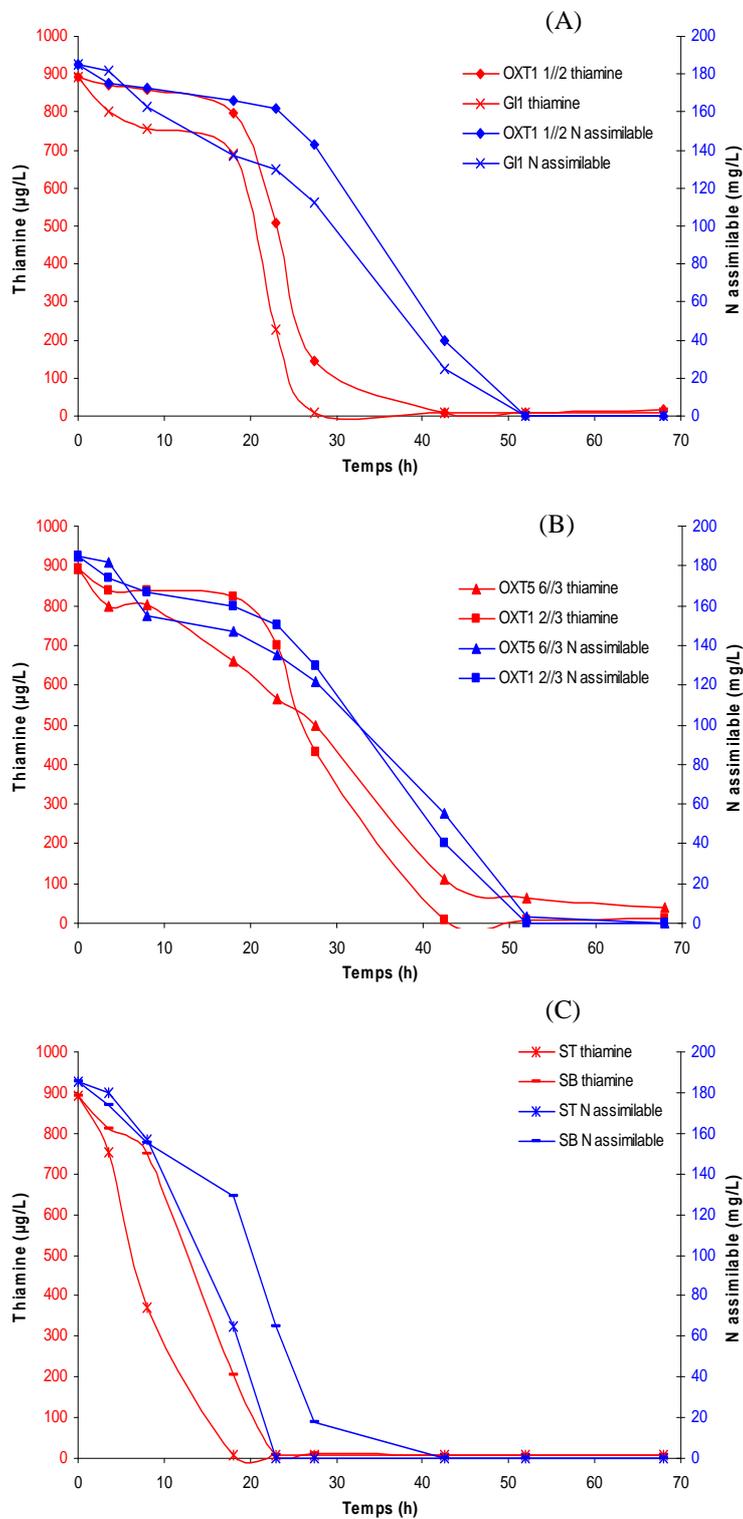


Figure 28 : Evolution de la concentration résiduelle en thiamine et en azote assimilable en fonction du temps pour 4 souches de *T. delbrueckii* : OXT1 1//2 et OXT1 2//3 (A), OXT5 6//3 et GI1 (B) et 2 souches de *S. cerevisiae* : ST et SB (C).

En conclusion, dans nos conditions, l'espèce *T. delbrueckii* est capable de consommer rapidement des quantités importantes de thiamine supérieures aux concentrations habituellement trouvées dans les moûts. L'assimilation intégrale de la thiamine est plus précoce que celle de l'azote et a lieu au cours de la formation du premier degré d'alcool, c'est-à-dire en début de phase de croissance cellulaire. Enfin, la vitesse de consommation de la thiamine est très variable selon les souches et est positivement corrélée à la concentration cellulaire maximale. La consommation rapide de grandes quantités de thiamine est un facteur à prendre en compte lors de la réalisation d'inoculations mixtes, en particulier dans le cas d'inoculation séquentielle où la souche de *S. cerevisiae*, inoculée dans un second temps, risque de manquer de thiamine et donc d'avoir des difficultés pour se développer.

2.8 Effet de la concentration en SO₂ et du pH du milieu sur le démarrage de la fermentation alcoolique

L'objectif de cette expérience est d'évaluer le comportement de l'espèce *T. delbrueckii* en tout début de la fermentation alcoolique dans des conditions œnologiques « extrêmes ». Nous nous sommes particulièrement intéressés à 2 facteurs jouant un rôle dans la sélection des populations au cours de la fermentation alcoolique: la concentration en SO₂ (dioxyde de soufre) libre dans le moût et la valeur du pH. La durée de la phase de latence, qui représente le temps d'adaptation des levures au moût, sera le paramètre cinétique évalué pour cette étude.

Le dioxyde de soufre inhibe la croissance de nombreuses levures non-*Saccharomyces* qui sont pour la plupart peu résistantes (Constanti *et al.*, 1998, Henick *et al.*, 1998 ; Romano et Suzzi, 1992). Cependant, seul le SO₂ libre, c'est-à-dire non combiné, a une activité antilevurienne (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). Il pénètre dans la cellule, soit par transport actif, soit par simple diffusion et réagit avec de nombreux constituants tels que les coenzymes (FAD, NAD), les cofacteurs et les vitamines. Il aurait également des effets sur de nombreux systèmes enzymatiques, sur les acides nucléiques et entraînerait une diminution importante de l'ATP (Romano et Suzzi, 1992). Le pH du vin joue un rôle important sur la combinaison du SO₂, à pH 3, la proportion de SO₂ actif pour une même dose de SO₂ total est plus importante qu'à pH 3,6. Autrement dit, pour une même dose de SO₂ total, l'action inhibitrice sur les levures est plus forte à pH 3 qu'à pH 3,6.

Le pH optimum pour le développement des levures se situe entre 5 et 6. Dans un milieu acide, comme le moût (pH entre 3 et 3,6), les levures peuvent alors éprouver des difficultés à se développer en particulier pour des pH inférieurs à 3 (Thomas *et al.*, 2002). En effet, chez les

eucaryotes, le maintien du pH intracellulaire est fonction de la variation du pH extracellulaire (Gillies et Deamer, 1979). Ainsi, pour maintenir le pH intracellulaire dans les conditions physiologiques optimales pour le métabolisme (entre 5,5 et 5,75), la levure est obligée d'excréter les protons intracellulaires. L'énergie nécessaire à cette tâche pour la survie cellulaire limite alors la croissance cellulaire (Imai et Ohno, 1995). De plus, les pH acides entraînent un ralentissement de la consommation des sucres (Torija *et al.*, 2003) et une diminution du transport actif de l'azote (Dubois et Grenson, 1979).

Un série d'expériences a été mise en place (tableau 12) pour comparer le comportement au début de la fermentation alcoolique de 10 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, Lm1T10, Lm2T7, Lm2T20, G11, OXT1 1//2, OXT1 18//33, OXT1 2//3, OXT5 6//3) et 2 souches de *S. cerevisiae* (ST qui est une souche commerciale avec une phase de latence courte et SB qui présente des phases de latence plus longues). L'expérience témoin correspond au milieu synthétique MS, contenant 1g/hL de SO₂ libre et ajusté à pH 3,3. Pour évaluer l'effet du SO₂, ce milieu a été enrichi pour atteindre des concentrations en SO₂ libre de 2,5 et 3,6 g/hL, correspondant respectivement à des concentrations en SO₂ total de 4,3 et 7,5 g/hL. Pour étudier l'effet pH, le pH du milieu MS a été modifié afin d'être ajusté à pH 3 et 3,6 considérés comme les pH extrêmes que l'on peut retrouver dans les moûts. Nous avons tenu compte, dans ce cas, du fait que le pouvoir de combinaison du SO₂ varie en fonction du pH. La dose de SO₂ totale à ajouter pour obtenir une concentration en SO₂ libre de 1g/hL a été ajustée selon le pH des 3 milieux.

Tableau 12 : Présentation des expériences ayant servies à l'évaluation de l'effet de la concentration en SO₂ et du pH du milieu sur le démarrage de la fermentation alcoolique.

Milieu		pH	SO ₂ libre (mg/L)
1	Témoin	3,3	1
2	Effet SO ₂	3,3	2,5
3		3,3	3,6
4	Effet pH	3	1
5		3,6	1

2.8.1 Effet SO₂

Les durées de phase de latence sur la modalité témoin (SO₂ libre = 1 g/hL, pH 3,3) sont significativement différentes entre les 10 souches de l'espèce *T. delbrueckii* qui présente une grande variabilité intraspécifique pour ce paramètre comme déjà observée précédemment (Chapitre II.2.3, partie Résultats et discussion). Les durées de phase de latence sont également significativement différentes entre les 10 souches de *T. delbrueckii* pour les milieux avec les concentrations en SO₂ plus élevées (figure 29). On peut également voir sur cette figure que, pour toutes les souches de *T. delbrueckii* et de *S. cerevisiae* utilisées dans notre expérience, plus la concentration en SO₂ libre est élevée plus la phase de latence est longue. Les phases de latence moyennes obtenues pour les 10 souches de *T. delbrueckii* varient significativement en fonction de la concentration en SO₂ libre. En effet, elle est de 34 h pour la concentration la plus faible, 68 h pour la concentration intermédiaire, soit 2 fois plus, et 163 h pour la plus forte concentration, soit 5 fois plus. Les durées de phase de latence moyennes sont également plus élevées pour l'espèce *S. cerevisiae* puisqu'elle est multipliée par 8 entre les 2 concentrations extrêmes ; elle atteint ainsi 145h pour la concentration la plus élevée. Par ailleurs, il faut noter que les durées de phase de latence de 4 souches de *T. delbrueckii* (31703, Lm1T10, Lm2T7 et OXT5 6//3) sont systématiquement inférieures à celle de la *S. cerevisiae* SB pour les deux concentrations en SO₂ libre les plus élevées, reflétant ainsi la résistance importante de certaines souches de l'espèce *T. delbrueckii* à des concentrations en SO₂ libre élevées.

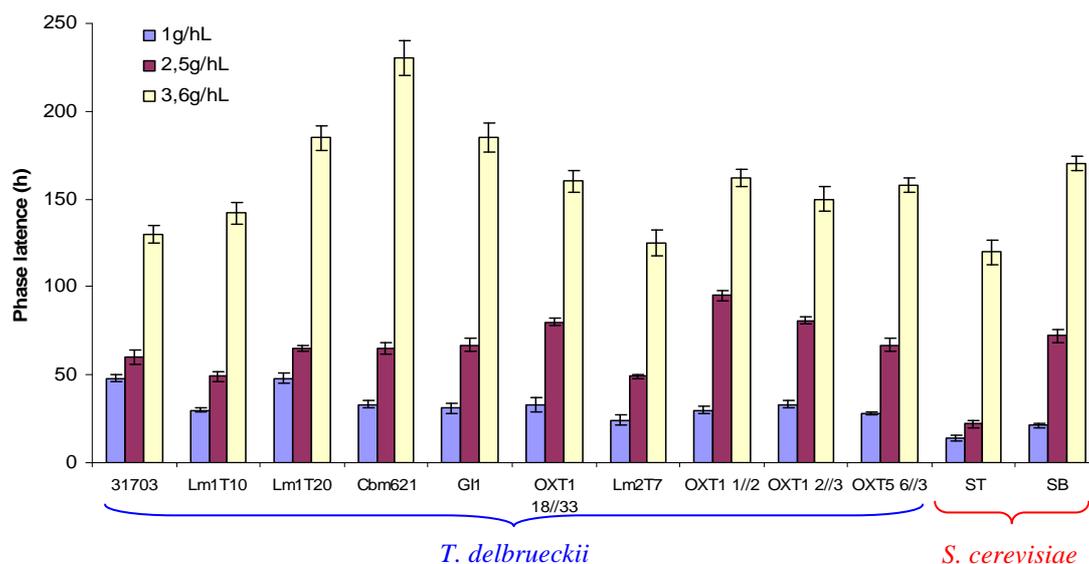


Figure 29 : Durées des phases de latence de 10 souches de *T. delbrueckii* et de 2 souches de *S. cerevisiae* sur 3 milieux synthétiques à pH 3,3 avec des concentrations en SO₂ libre différentes de : 1 ; 2,5 et 3,6 g/hL. Moyenne de 3 répétitions. Ecart type max ± 1.

2.8.2 Effet pH

Les durées de phase de latence sont significativement différentes entre les 10 souches de l'espèce *T. delbrueckii* pour les milieux aux pH extrêmes de 3 et 3,6. La durée de phase de latence moyenne pour les 10 souches de *T. delbrueckii* est de 33 h au pH 3,3, 45h (soit 1,31 fois plus) à pH 3 et 46h (soit 1,34 fois plus) à pH 3,6 mais ces phases de latence ne sont pas significativement différentes. Le pH, dans nos conditions, n'a donc pas d'effet global ou prévisible sur les phases de latence de l'espèce *T. delbrueckii* bien qu'il influence individuellement les durées de phase de latence de chaque souche (figure 30). En effet, si la majorité des souches ont leur phase de latence la plus courte au pH témoin (3,3), certaines ont des phases de latence plus courtes à pH 3 : Lm1T20 et Lm1T10. Dans les mêmes conditions, les durées de phase de latence des 2 *S. cerevisiae* ne sont pas influencées par les conditions de pH (pas de différence significative).

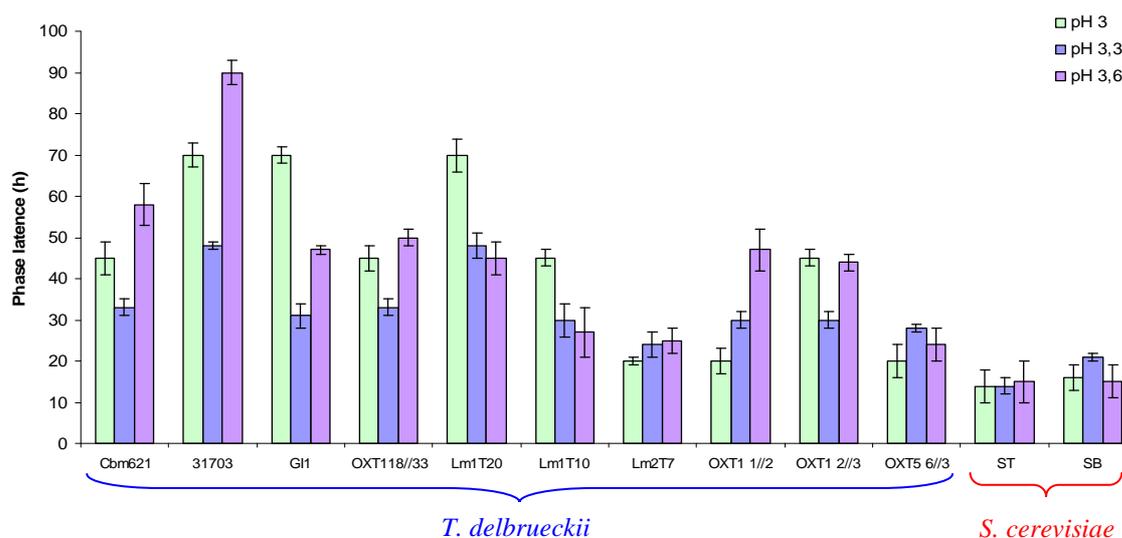


Figure 30 : Durées des phases de latence de 10 souches de *T. delbrueckii* et de 2 souches de *S. cerevisiae* sur 3 milieux synthétiques (SO_2 libre = 1 g/hL) ajustés à 3 pH différents : 3 ; 3,3 et 3,6. Moyenne de 3 répétitions. Ecart type max ± 1 .

En conclusion, nous pouvons dire que l'espèce *T. delbrueckii* présente une grande variabilité intraspécifique au niveau de ses phases de latence, quel que soit le pH ou les concentrations en SO_2 . Certaines souches de *T. delbrueckii* sont assez résistantes à l'augmentation de la concentration en SO_2 car elles sont capables de réaliser la fermentation alcoolique dans un milieu avec 3,6 g/hL de SO_2 libre correspondant à une dose de 7,5 g/hL de SO_2 total.

L'augmentation de la concentration en SO₂ allonge cependant la durée de phase de latence, mais ce phénomène se retrouve également pour l'espèce *S. cerevisiae*. Par ailleurs, certaines souches de *T. delbrueckii* ont des phases de latence plus courtes que la *S. cerevisiae* SB aux 2 concentrations en SO₂ les plus élevées. L'effet du pH sur les durées de phase de latence est souche dépendant pour l'espèce *T. delbrueckii* : la majorité des souches ont des phases de latence plus courtes à pH 3,3 mais les pH extrêmes 3 ou 3,6 réduisent les durées de phases de latence de certaines souches. Ce comportement est différent de celui de l'espèce *S. cerevisiae* où les durées de phases de latence ne sont pas influencées par le pH.

2.9 Capacité biotique de l'espèce *T. delbrueckii*

Peu de données sont disponibles sur le suivi de la concentration cellulaire au cours de la fermentation alcoolique de l'espèce *T. delbrueckii*. Par ailleurs, une étude assez récente sur *S. cerevisiae* a montré que la capacité biotique, c'est-à-dire la capacité à se multiplier, jouait un rôle déterminant sur la vitesse globale de la fermentation alcoolique. La population de levure maximale ainsi que le volume cellulaire de cette population, sont donc des paramètres à prendre en considération pour la sélection de souches de levure de l'espèce *S. cerevisiae* (Albertin et Marullo, communication personnelle ; Spor *et al.*, 2008).

Le but de cette étude est donc d'évaluer la capacité biotique, que nous nommerons X_{max}, ainsi que la taille moyenne des cellules de l'espèce *T. delbrueckii* au cours de la fermentation alcoolique. Nous avons donc suivi, au cours de la fermentation sur milieu synthétique MS, la concentration cellulaire de 7 souches de levures *T. delbrueckii* (Cbm621, 31703, GI1, Lm1T20, OXT1 18/33, Lm1T10 et OXT1 1//2) et 2 souches de *S. cerevisiae* (ST et SB) à l'aide d'un compteur à particules Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter). Cet appareil permet de dénombrer les cellules d'une suspension mais également de donner des informations sur la taille et le volume des levures contenues dans cette suspension.

L'azote assimilable du milieu a été entièrement consommé par toutes les souches utilisées dans cette expérience. Il nous est donc possible de comparer leurs performances. Le suivi des concentrations cellulaires au cours du temps est représenté sur la figure 31. L'espèce *T. delbrueckii* est caractérisée par une grande variabilité intraspécifique pour le paramètre X_{max}, avec des populations maximales comprises entre $1,2 \cdot 10^8$ et $2,4 \cdot 10^8$ cellules/mL (différences significatives). Ces populations sont atteintes après 67 à 122h. On peut également voir sur ce graphe que, malgré un démarrage de croissance plus tardif dû à une durée de phase de latence plus longue, la capacité biotique de 6 souches de *T. delbrueckii* (GI1, OXT1 1//2, Lm1T10,

Lm1T20, Cbm621 et OXT1 18//33) sur les 7 testées est largement supérieure à celle des 2 souches de *S. cerevisiae*. La septième souche de *T. delbrueckii*, 31703 a, quant à elle, une capacité biotique similaire aux 2 *S. cerevisiae* mais avec une vitesse de croissance beaucoup plus faible. La population maximale moyenne de l'espèce *T. delbrueckii* est alors supérieure à celle de *S. cerevisiae* soit respectivement $1,73 \cdot 10^8$ et $1,17 \cdot 10^8$ cellules/mL (différence significative). Il est important de noter les grandes capacités biotiques des souches *T. delbrueckii* GI1 et OXT1 1//2 qui ont une population maximale dépassant les $2 \cdot 10^8$ cellules/mL.

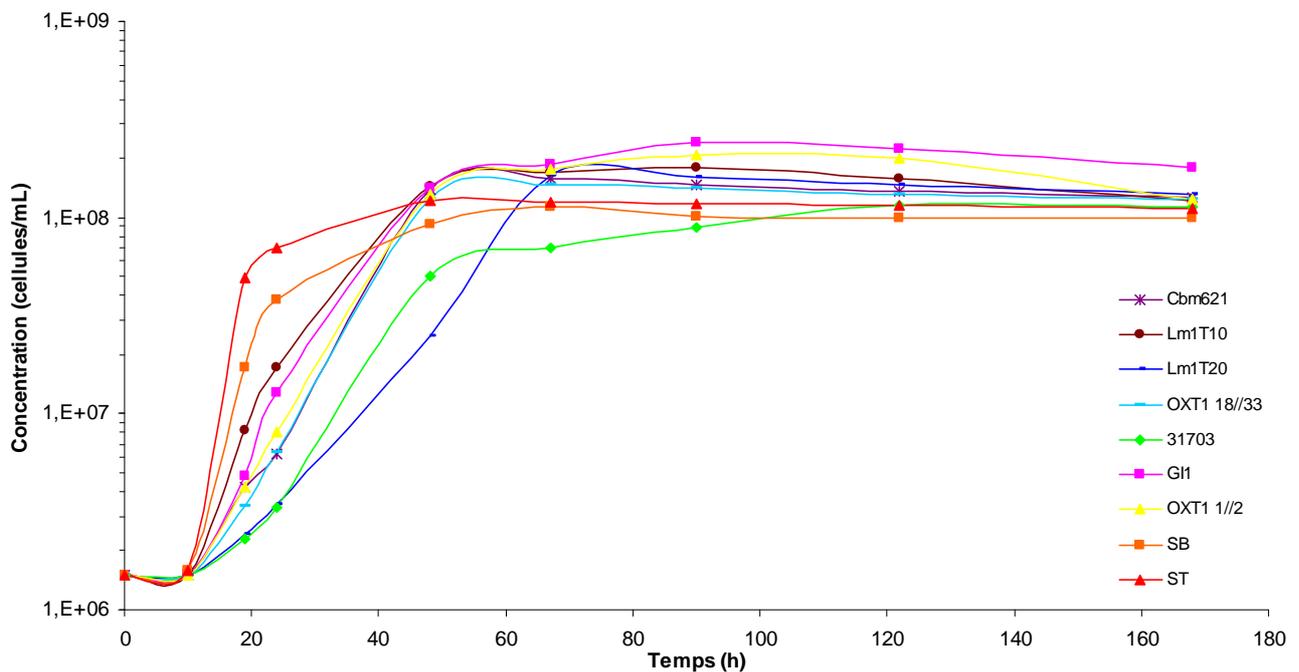


Figure 31 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps sur milieu MS de 7 souches de *T. delbrueckii* (Cbm621, 31703, GI1, Lm1T20, OXT1 18//33, Lm1T10 et OXT1 1//2) et de 2 souches de *S. cerevisiae* (ST et SB). Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max de $\pm 5 \cdot 10^6$.

La figure 32 est un exemple des graphiques obtenus lors du comptage de la concentration cellulaire avec le compteur à particules. On peut voir sur cette figure où nous avons superposé le comptage d'une population de cellules de *T. delbrueckii* avec celui d'une souche de *S. cerevisiae*, que la majorité des levures ont une taille comprise entre 3,5 et 5,5 μm pour la souche *T. delbrueckii* et entre 4,5 et 6,5 μm pour la souche de *S. cerevisiae*. Les tailles moyennes des 2 populations prises comme exemple sont alors de 4,3 μm pour la souche *T. delbrueckii* et 5,6 μm pour la souche *S. cerevisiae*.

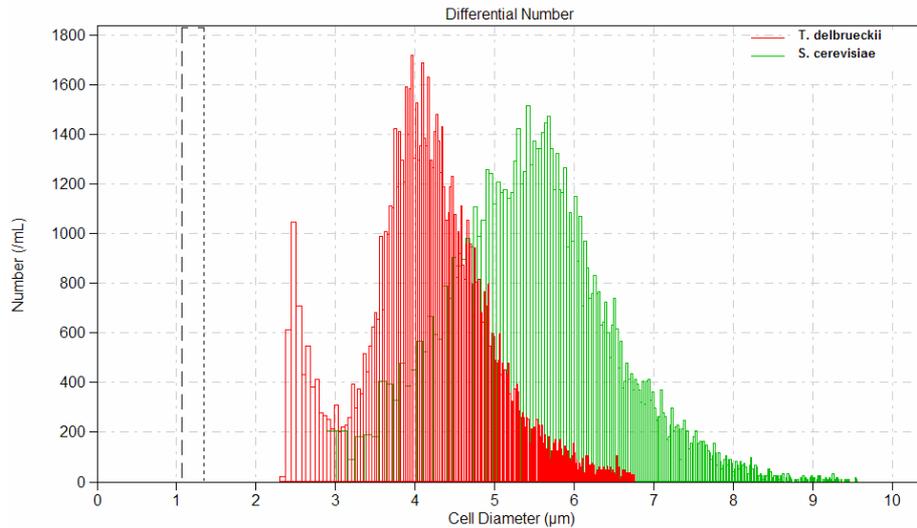


Figure 32 : Exemple de graphiques obtenus lors de l'analyse des populations d'une souche de *T. delbrueckii* et d'une souche de *S. cerevisiae* par compteur à particules sur milieu MS.

La figure 33 reporte les tailles moyennes des populations des 7 souches de *T. delbrueckii* et des 2 souches de *S. cerevisiae* au moment de l'obtention de leur population maximale. Les tailles des différentes souches de *T. delbrueckii* sont significativement différentes entre elles et varient de 3,4 à 4,7 µm. La taille moyenne des 7 souches de *T. delbrueckii* est, quant à elle, significativement inférieure à la taille moyenne des 2 *S. cerevisiae* puisqu'elles sont respectivement de 4 et 5,6 µm. Cette différence de taille est illustrée par les photos des souches *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et *S. cerevisiae* ST prises à l'aide d'un microscope électronique à balayage (figures 34 et 35). On peut voir, d'après ces photos, que les levures de l'espèce *T. delbrueckii* sont plus petites que celles de *S. cerevisiae* et ont une forme plus ronde.

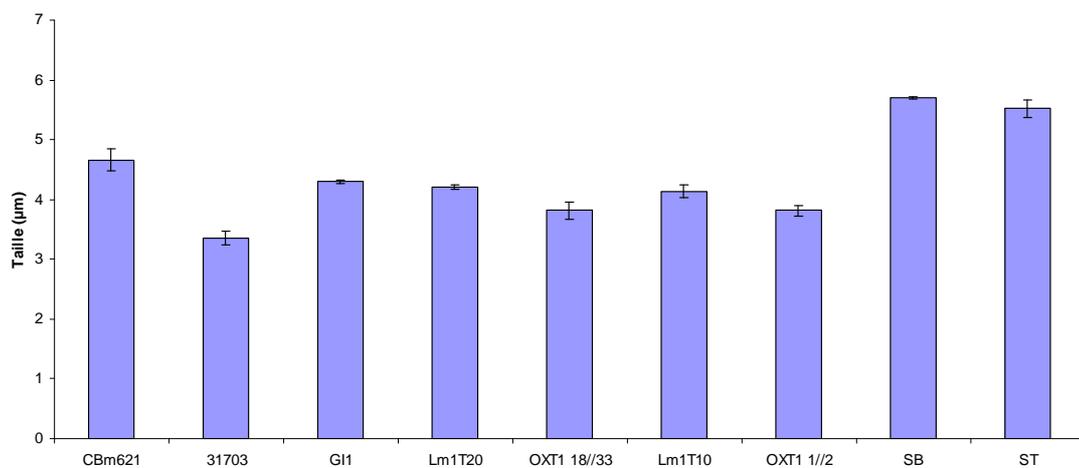


Figure 33 : Taille moyenne des cellules de 7 souches de *T. delbreckii* (Cbm621, 31703, GI1, Lm1T20, OXT1 18//33, Lm1T10 et OXT1 1//2) et 2 souches de *S. cerevisiae* (ST et SB) en fin de croissance sur milieu MS. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max de $\pm 0,3$.

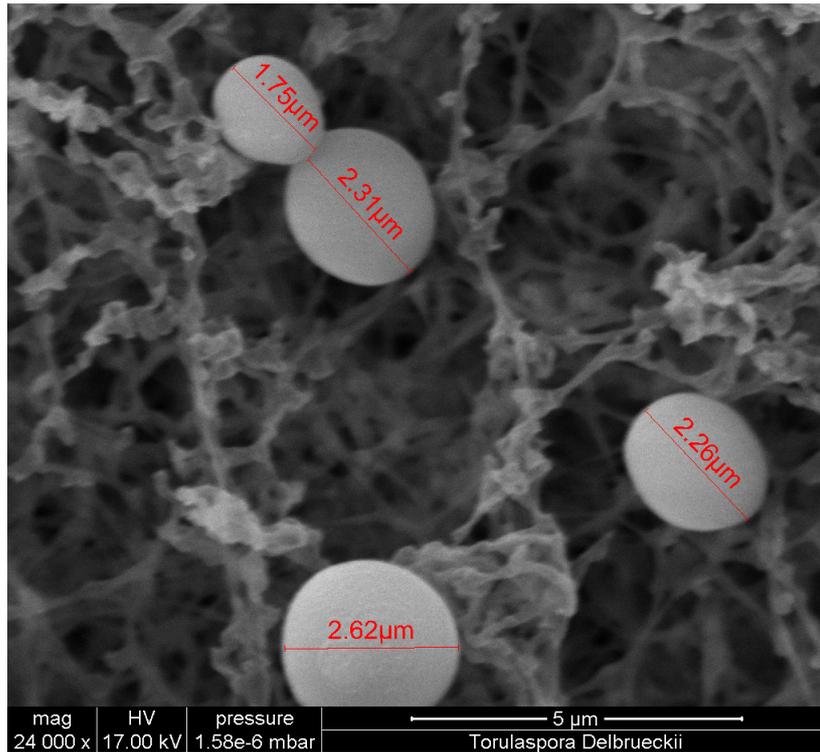


Figure 34 : *Torulaspora delbrueckii* OXT1 1//2 (Microscopie électronique à balayage : grossissement X 24000) Bordeaux Imaging Center - Pôle d'Imagerie Electronique - Université Bordeaux 2.

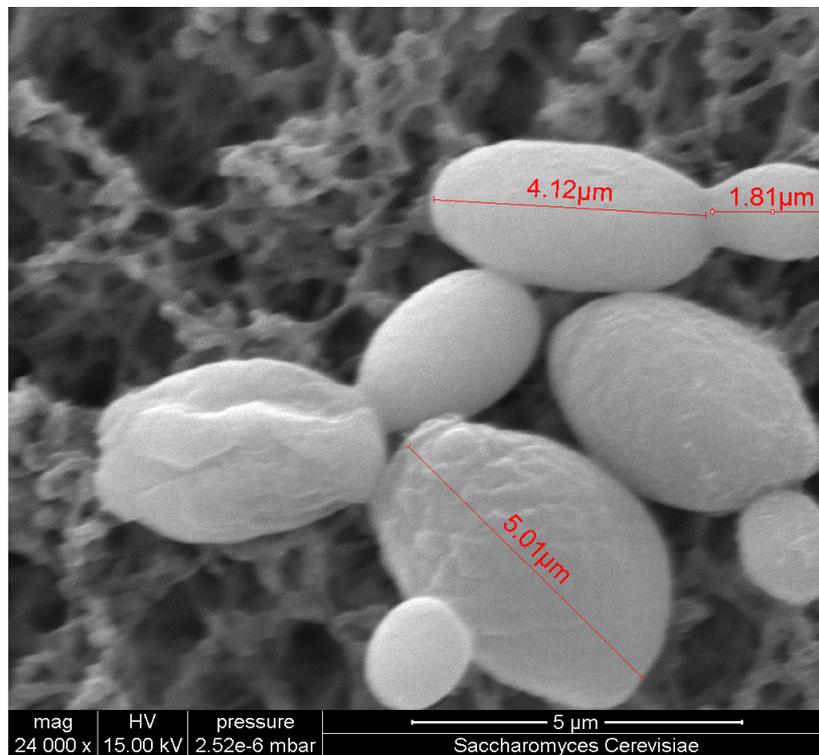


Figure 35 : *Saccharomyces cerevisiae* ST (Microscopie électronique à balayage : grossissement X 24000) Bordeaux Imaging Center - Pôle d'Imagerie Electronique - Université Bordeaux 2.

Le volume cellulaire total exprimé en $\mu\text{m}^3/\text{mL}$, c'est-à-dire le volume occupé par l'ensemble des levures en μm^3 dans 1 mL de suspension, est représenté sur la figure 36 pour les différentes souches de cette expérience, au moment de l'obtention des populations maximales. Comme pour la concentration cellulaire maximale et la taille moyenne des cellules, le volume cellulaire total est significativement différent entre les souches de l'espèce *T. delbrueckii* et varie de $4,8$ à $9,7 \cdot 10^9 \mu\text{m}^3/\text{mL}$. Cependant, malgré une concentration cellulaire maximale moyenne très supérieure à celle de *S. cerevisiae*, le volume cellulaire moyen représenté par les 7 souches de *T. delbrueckii* est significativement plus faible que celui de *S. cerevisiae*. En effet, il est de $7,1 \cdot 10^9 \mu\text{m}^3/\text{mL}$ pour l'espèce *T. delbrueckii* contre $1,1 \cdot 10^{10} \mu\text{m}^3/\text{mL}$ pour *S. cerevisiae*, soit 1,5 fois plus. Le volume cellulaire plus élevé de l'espèce *S. cerevisiae* pourrait être une explication des meilleures performances fermentaires de cette espèce en comparaison à l'espèce *T. delbrueckii*. Il faut cependant noter que ces volumes sont approximatifs car le logiciel du compteur à particules considère que toutes les cellules sont rondes lors de son calcul. Or, nous avons vu précédemment que les levures *T. delbrueckii* sont bien plus rondes que les levures *S. cerevisiae*. De plus, le logiciel ne tient pas compte de la présence des bourgeons, ce qui signifie qu'une levure qui bourgeonne aura un diamètre surestimé et donc un volume cellulaire surestimé. Par ailleurs, le rapport du volume cellulaire total sur le nombre total de cellules, c'est-à-dire le volume moyen d'une levure, est significativement plus faible pour l'espèce *T. delbrueckii*, soit $41,3 \mu\text{m}^3/\text{cellule}$, que pour l'espèce *S. cerevisiae*, soit $98,1 \mu\text{m}^3/\text{cellule}$.

Par ailleurs, nous n'avons trouvé aucune corrélation au sein de cette espèce entre la concentration cellulaire maximale, la taille ou bien encore le volume cellulaire de la population et la production maximale d'éthanol.

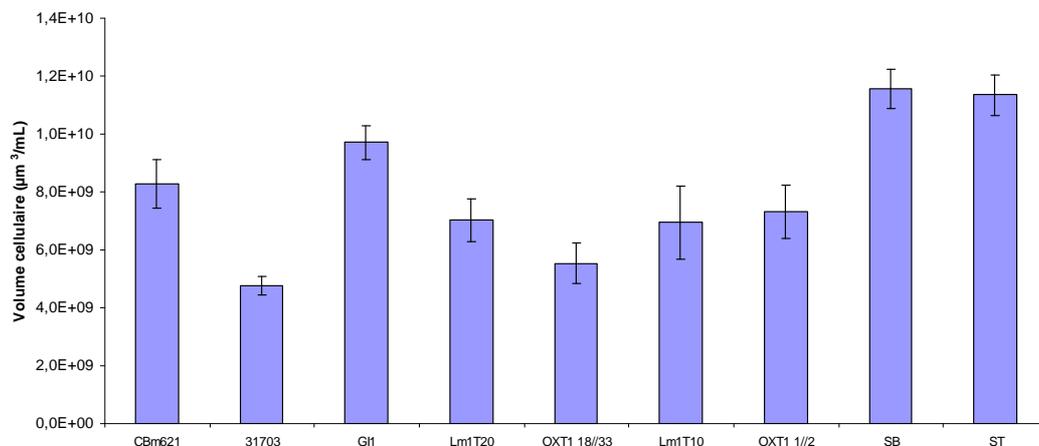


Figure 36 : Volume cellulaire total des populations de 7 souches de *T. delbreckii* (Cbm621, 31703, GI1, Lm1T20, OXT1 18/33, Lm1T10 et OXT1 1//2) et 2 souches de *S. cerevisiae* (ST et SB) en fin de croissance sur milieu MS. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max de $\pm 1,5 \cdot 10^9$.

En conclusion, l'espèce *T. delbrueckii* présente une variabilité intraspécifique importante concernant les caractéristiques de sa population, c'est-à-dire sa capacité biotique (X_{max}), sa taille moyenne et son volume cellulaire. Sa capacité biotique est supérieure à celle de l'espèce *S. cerevisiae*. Ces résultats sont en désaccord avec de précédents travaux qui relatent une population maximale plus faible pour l'espèce *T. delbrueckii* en comparaison à l'espèce *S. cerevisiae* (Bely *et al.*, 2008 ; Ciani, 1997, Ciani *et al.*, 2006 ; Mauricio *et al.*, 1991). Il est cependant important de noter qu'aucune de ces études n'a été réalisée à l'aide d'un compteur à particules, la technique de l'étalement sur milieux gélosés étant privilégiée. Par ailleurs, nos travaux ont montré que les levures *T. delbrueckii* étaient plus petites en taille et en volume cellulaire qu'une levure *S. cerevisiae*. A l'échelle de la population, bien que le nombre de levures de l'espèce *T. delbrueckii* soit en moyenne largement supérieur à celui de l'espèce *S. cerevisiae*, le volume cellulaire moyen occupé par la population de levures de *T. delbrueckii* est inférieur à celui de l'espèce *S. cerevisiae*, ce qui pourrait être une explication des meilleures performances fermentaires de cette espèce en comparaison à l'espèce *T. delbrueckii*. Cependant, au sein de l'espèce *T. delbrueckii*, aucune corrélation entre la production maximale d'éthanol et la concentration cellulaire maximale, la taille ou le volume cellulaire n'a pu être mise en évidence.

III Adaptation au stress osmotique

Comme nous l'avons vu précédemment dans ce manuscrit (Chapitre II.2.4, partie Résultats et Discussion), l'espèce *T. delbrueckii* est caractérisée par une faible production d'AV et de glycérol en fin de fermentation. La production de ces 2 composés est très inférieure à celle de *S. cerevisiae* lors de la fermentation d'un milieu, provoquant un stress osmotique important pour la levure (milieu synthétique MS ajusté à 350 g/L de sucres). Au cours de nos expériences, il a été également montré que la production d'AV et de glycérol chez l'espèce *T. delbrueckii* est plus influencée par la souche utilisée (grande variabilité intraspécifique) que par la concentration initiale en sucres du milieu. Ce phénomène est différent pour l'espèce *S. cerevisiae* dont la production d'AV et de glycérol est fortement liée à la concentration initiale en sucres du milieu, indépendamment de la quantité de sucres fermentés (Lafon-Laffourcade et Ribéreau-Gayon, 1977). En effet, pour cette espèce, plus la concentration initiale est élevée, plus forte est la production de ces deux composés. Une autre différence entre les 2 espèces, mise en avant lors de notre travail, est le fait que chez *T. delbrueckii*, la production de glycérol n'est pas couplée à la production d'AV pour les milieux à fortes concentrations en

sucres, contrairement à l'espèce *S. cerevisiae*. Chez cette dernière, le phénomène est expliqué par le fait que cette espèce augmente sa concentration en glycérol intracellulaire pour contrebalancer la pression osmotique du milieu, ce qui induit une augmentation de la production d'acide acétique pour équilibrer le potentiel d'oxydoréduction de la cellule (Blomberg, 2000 ; Blomberg et Adler 1989, 1992 ; Erasmus *et al.*, 2003 ; Hohmann, 2002).

Toutes ces différences, entre les 2 espèces, nous laissent penser que l'espèce *T. delbrueckii* présente un mécanisme de réponse au stress osmotique différent de celui de l'espèce *S. cerevisiae*. Pour essayer de comprendre ce mécanisme, nous avons réalisé 2 expériences qui sont présentées ci-dessous.

1 Evolution de la production d'AV et de glycérol au cours de la fermentation alcoolique

Le but de cette nouvelle expérience est de compléter celle, présentée au Chapitre II.2.4, de la partie Résultats et Discussion, où nous avons comparé les concentrations en AV et glycérol obtenues en fin de réaction, c'est à dire pour des degrés alcooliques très différents. Ici, nous allons comparer l'évolution de ces 2 composés, pour l'espèce *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, en fonction de l'avancement de la réaction. Pour apporter des informations complémentaires, l'évolution de la concentration cellulaire ainsi que de la biomasse (exprimée en g/L de matière sèche) ont également été suivies.

Cette expérience a été réalisée en fermenteurs à l'aide de l'installation automatisée du laboratoire afin de suivre précisément l'évolution du dégagement de CO₂. Les modalités n'ont pas été doublées. En effet, nous avons privilégié le nombre de souches dans cet essai plutôt que la répétition des modalités, afin de pouvoir comparer le comportement des 2 espèces. Les fermentations alcooliques ont été réalisées à 24°C sur le milieu synthétique MS ajusté à 350 g/L de sucres. Huit souches ont été utilisées : 5 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3). Ces souches ont été choisies pour chaque espèce, en fonction de leurs aptitudes plus ou moins importantes à produire de l'AV dans ce milieu. Les souches *T. delbrueckii* 31703 et Cbm621 sont de très faibles productrices, OXT1 1//2 et Lm2T7 de faibles productrices et A2 une plus forte productrice. De même pour l'espèce *S. cerevisiae*, la souche ST est une faible productrice, la souche VL3 une productrice modérée et la souche SB une forte productrice. Il est important

de rappeler, que nous n'avons pas dosé la quantité d'acide acétique mais la production d'AV, constituée à 95% d'acide acétique.

Comme déjà constaté au cours de notre précédente expérience, les concentrations en AV et glycérol obtenues en fin de fermentation, c'est-à-dire pour différents degrés alcooliques formés, sont significativement plus faibles pour l'espèce *T. delbrueckii* que pour l'espèce *S. cerevisiae*. En effet, la concentration moyenne finale en AV est de $0,16 \pm 0,08$ et $0,8 \pm 0,23$ g/L et la concentration finale en glycérol de $4,84 \pm 0,67$ et de $9,77 \pm 3,51$ g/L pour respectivement l'espèce *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*. On peut donc se poser la question si pour un même avancement de la réaction, c'est-à-dire pour un dégagement de CO₂ équivalent, les résultats sont similaires.

Les productions d'AV et de glycérol ont été évaluées à 2 avancements de la réaction, soit à 12 et 42 g/L de CO₂ dégagés, correspondant respectivement à 1,5 et environ 5 %vol. éthanol formés. La formation de 1,5 %vol. éthanol coïncide approximativement, dans nos conditions, à la fin des phases de croissance cellulaire. Les concentrations obtenues pour ces 2 avancements de la réaction, sont présentées pour toutes les souches sur la figure 37. Les productions moyennes d'AV et de glycérol pour les 2 avancements de la réaction sont toujours significativement inférieures pour l'espèce *T. delbrueckii* (tableau 13).

Tableau 13 : Concentrations moyennes en AV et glycérol en fin de phase de croissance et à 5 %vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3).

		AV (g/L)	Glycérol (g/L)
Fin croissance	<i>T. delbrueckii</i>	$0,14 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,09$
	<i>S. cerevisiae</i>	$0,29 \pm 0,11$	$1,77 \pm 0,50$
5 %vol. éthanol	<i>T. delbrueckii</i>	$0,31 \pm 0,08$	$4,38 \pm 0,25$
	<i>S. cerevisiae</i>	$0,60 \pm 0,19$	$6,57 \pm 1,44$

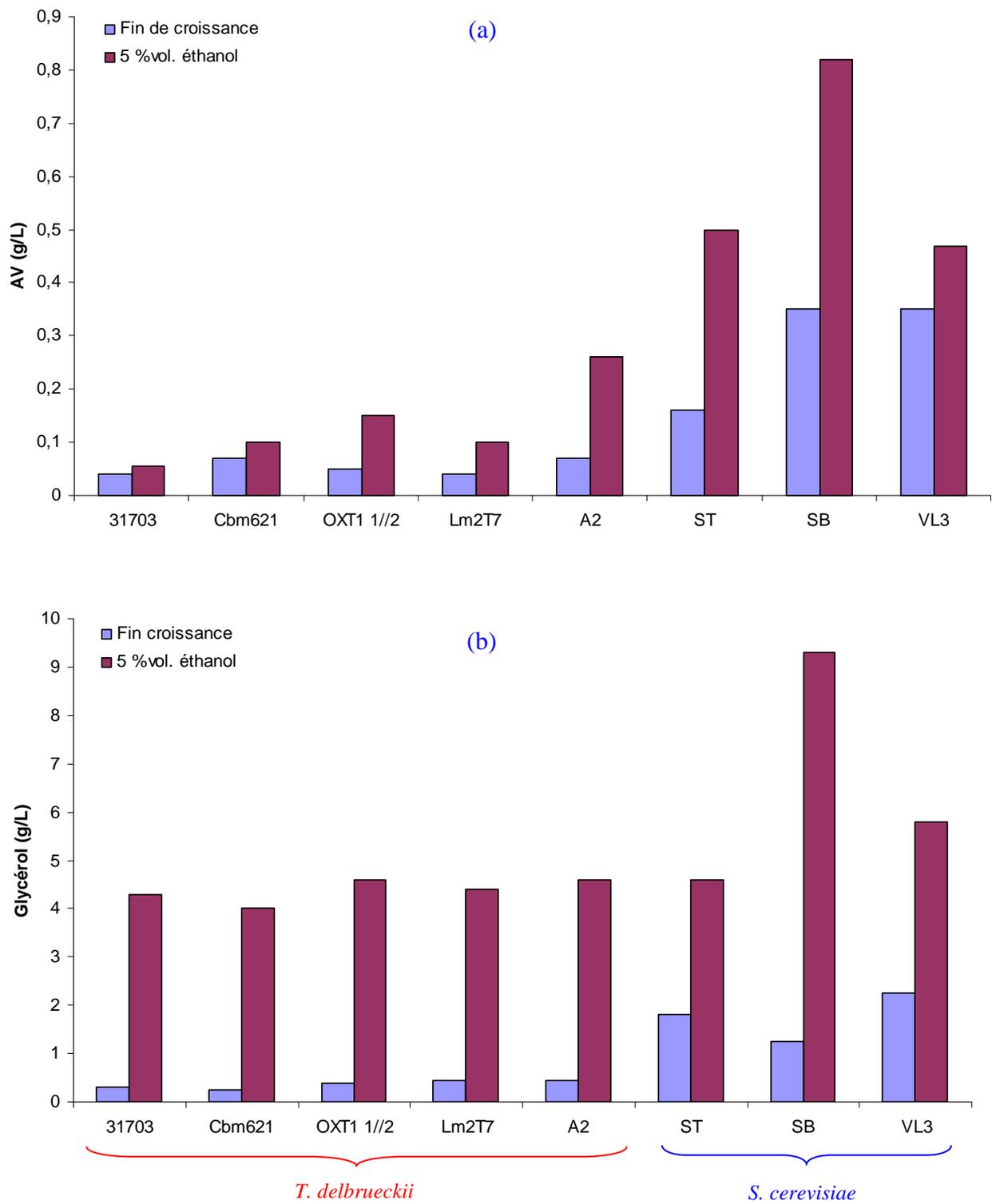


Figure 37 : Concentrations en AV (a) et glycérol (b) en fin de phase de croissance et à 5 %vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* et 3 souches de *S. cerevisiae*.

Par ailleurs, une autre hypothèse pouvant expliquer la plus faible production de ces 2 composés par l'espèce *T. delbrueckii* pourrait être liée à une croissance différente des 2 espèces. Or, la population maximale moyenne atteinte par les 5 souches de *T. delbrueckii* est similaire à la population moyenne obtenue pour les 3 souches de *S. cerevisiae* soit respectivement $8,53 \cdot 10^7 \pm 1,15 \cdot 10^7$ et $8,50 \pm 1,36 \cdot 10^7$ cellules/mL. La production d'AV et de glycérol divisée par la concentration cellulaire, donne donc des résultats similaires, c'est-à-dire que l'espèce *T. delbrueckii* produit moins d'AV et de glycérol par cellule que l'espèce *S. cerevisiae*.

L'estimation de ces productions ramenées au gramme de matière sèche nous a semblé plus pertinente, pour comparer les 2 espèces, que des productions exprimées par cellule. En effet, la matière sèche représente mieux la richesse en enzymes d'une population que son nombre de cellules.

Comme nous l'avons vu précédemment au cours de la caractérisation sur milieu synthétique MS, l'espèce *T. delbrueckii* a des cellules de plus petites tailles que l'espèce *S. cerevisiae* (Chapitre II.2.9, partie Résultats et Discussion). Le volume cellulaire de sa population, exprimée en $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ est donc plus petit que celui de l'espèce *S. cerevisiae*. Des résultats semblables ont été trouvés au cours de cette expérience, lors de l'estimation de la biomasse formée (en gramme de matière sèche par litre). En effet, la population maximale moyenne de l'espèce *T. delbrueckii* représente une biomasse de $2,28 \pm 0,31$ g/L contre $4,46 \pm 0,50$ g/L pour l'espèce *S. cerevisiae* (différence significative). Autrement dit, pour une concentration cellulaire équivalente, la biomasse (ou matière sèche) exprimée en g/L de la population de *T. delbrueckii* est donc inférieure à celle de *S. cerevisiae*. Les quantités d'AV et de glycérol par mg de biomasse, obtenues en divisant les productions d'AV par la quantité de matière sèche pour les 2 avancements de la réaction, sont présentées sur la figure 38. La production d'AV ramenée à la matière sèche pour l'espèce *T. delbrueckii* est toujours significativement inférieure à celle de *S. cerevisiae* (tableau 14). Elle est particulièrement faible pendant la croissance (12g/L de CO_2), puis augmente légèrement lorsque 5 % vol. éthanol ont été produits. Par contre, la production de glycérol ramenée à la matière sèche de l'espèce *T. delbrueckii* est significativement inférieure pendant la période de croissance mais augmente de façon importante pendant la phase stationnaire et de déclin pour arriver à des concentrations moyennes finales supérieures, mais non significativement différentes de *S. cerevisiae*. Chez cette dernière, l'augmentation en continu de la production d'AV et de glycérol conduit à des quantités finales élevées.

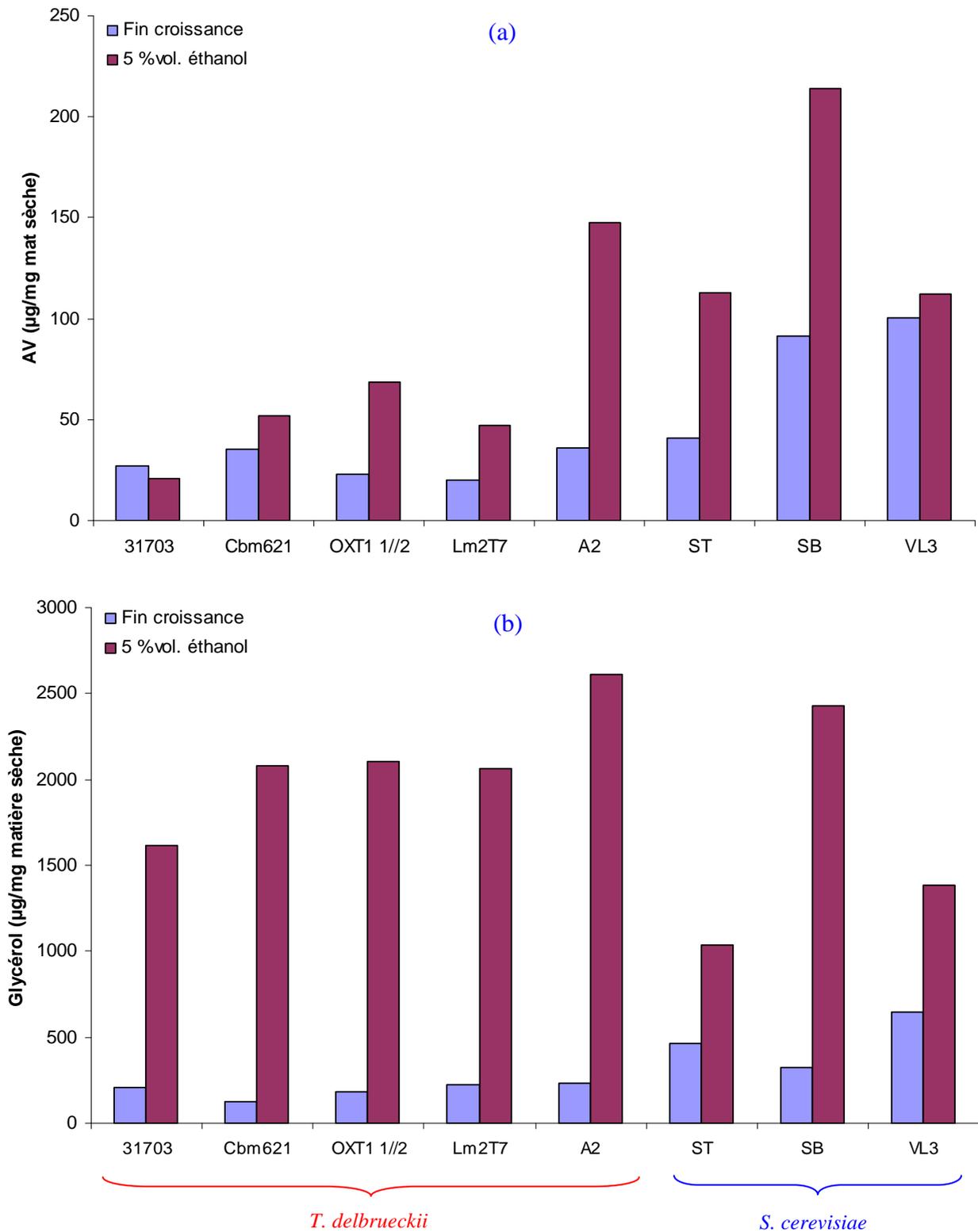


Figure 38 : Quantités d'AV (a) et de glycérol (b) formés par mg de matière sèche en fin de phase de croissance et à 5 %vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* et 3 souches de *S. cerevisiae*.

Tableau 14 : Rendements moyens AV/matière sèche et glycérol/matière sèche en fin de phase de croissance et à 5 %vol. éthanol pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3).

		AV/matière sèche ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Glycérol/matière sèche ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Fin croissance	<i>T. delbrueckii</i>	28 \pm 7	194 \pm 42
	<i>S. cerevisiae</i>	78 \pm 32	478 \pm 160
5 %vol. éthanol	<i>T. delbrueckii</i>	67 \pm 28	2095 \pm 355
	<i>S. cerevisiae</i>	146 \pm 59	1618 \pm 724

En résumé de cette partie, la production globale d'AV et de glycérol, exprimée en g/L, par l'espèce *T. delbrueckii* est toujours inférieure à celle de *S. cerevisiae* quel que soit le moment du prélèvement (fin de croissance, à 5 %vol. éthanol et en fin de réaction). La production d'AV est également toujours plus faible lorsqu'elle est exprimée par cellule ou par mg de matière sèche. Par contre, la production de glycérol, exprimée par mg de matière sèche, est inférieure pour l'espèce *T. delbrueckii* en fin de phase de croissance mais équivalente à 5 %vol. éthanol, alors qu'elle est plus faible si on l'exprime par nombre de cellules. Une autre hypothèse permettant d'expliquer la plus faible production d'AV et de glycérol de l'espèce *T. delbrueckii*, par rapport à l'espèce *S. cerevisiae*, pourrait être un flux métabolique plus faible de cette espèce. Si l'on regarde les vitesses de fermentation exprimées en grammes de CO₂ dégagé/L/h, qui reflètent le flux métabolique, on voit effectivement que la vitesse globale est plus faible pour l'espèce *T. delbrueckii* (figure 39). Si l'on tient compte de la production de biomasse, en calculant le flux spécifique, c'est-à-dire le rapport vitesse de fermentation sur matière sèche, en fin de phase de croissance (là où le flux est le plus important), le flux spécifique est équivalent entre les 2 espèces (pas de différence significative). En effet, comme l'indique le tableau 15, les flux spécifiques en phase de croissance (mi-croissance) ou en fin de croissance cellulaire, c'est à dire lorsque la Vmax est obtenue, sont similaires et identiques entre les 2 espèces.

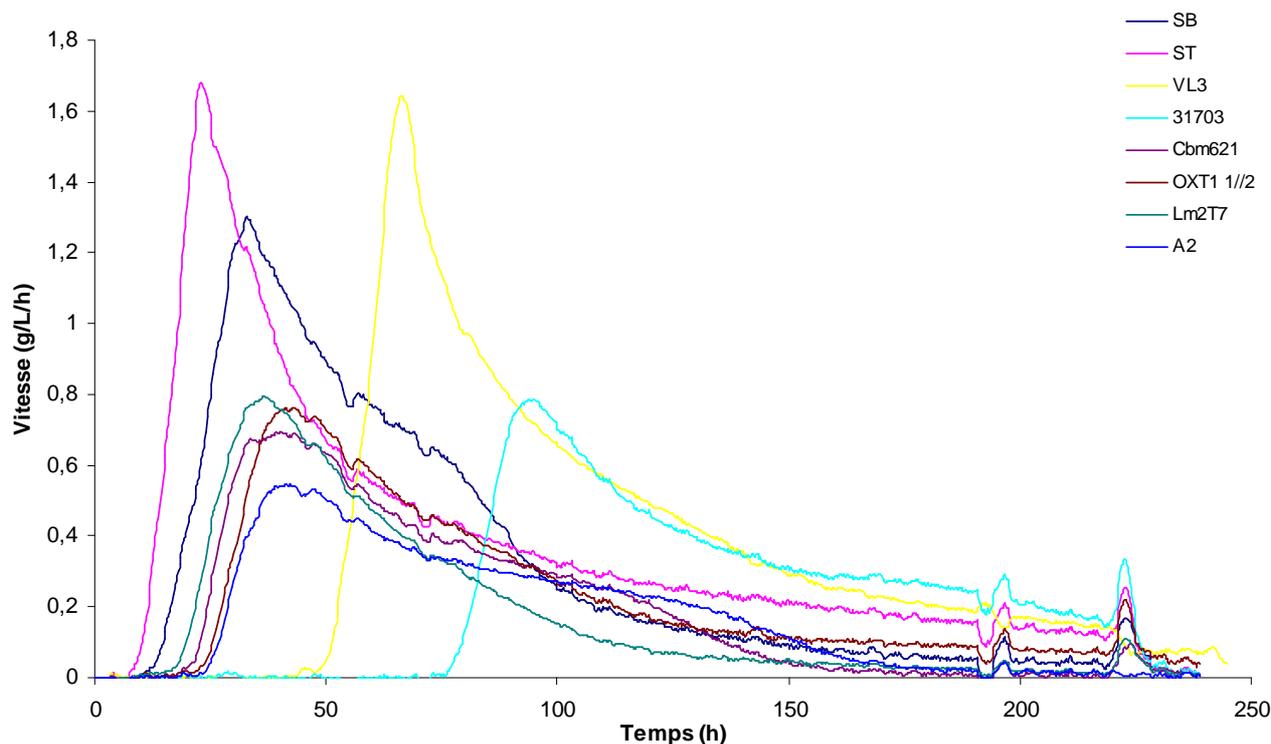


Figure 39 : Vitesses de dégagement de CO₂ en fonction du temps pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et les 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3).

Tableau 15 : Valeurs moyennes des vitesses de fermentation, de la biomasse (matière sèche) et des vitesses spécifiques (vitesse/biomasse) en phase de croissance et en fin de phase de croissance (au moment de l'obtention de la Vmax.) pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3).

		Vitesse (g/L/h)	Biomasse (g/L)	Vitesse spécifique (g/g biomasse/h)
Phase croissance	<i>T. delbrueckii</i>	0,58 ± 0,23	1,63 ± 0,65	0,29 ± 0,08
	<i>S. cerevisiae</i>	0,73 ± 0,66	2,12 ± 1,60	0,32 ± 0,05
Fin croissance	<i>T. delbrueckii</i>	0,71 ± 0,11	2,28 ± 0,31	0,31 ± 0,03
	<i>S. cerevisiae</i>	1,53 ± 0,21	4,46 ± 0,50	0,34 ± 0,03

La production d'AV en fonction de la production de glycérol est représentée sur la figure 40. La production d'AV semble couplée à la production de glycérol, tout au long de la fermentation pour les 3 souches de *S. cerevisiae*. Par contre, pour les souches de *T. delbrueckii*, si le glycérol est produit tout au long de la fermentation, sa production n'est pas toujours associée à une production d'AV. En effet, pendant la phase de croissance, il y a une production couplée d'AV et de glycérol, alors que pendant la phase stationnaire de croissance il n'y a plus de couplage. Puis, en fin de fermentation, l'AV est de nouveau produite en même temps que le glycérol. L'augmentation importante d'AV en fin de fermentation, remarquée pour 3 des 4 souches étudiées, est peut être due à une sensibilité plus importante de cette espèce aux conditions défavorables du milieu (augmentation teneur en alcool, manque d'azote...). Comme pour l'expérience précédente (Chapitre II.2.4, partie Résultats et Discussion), la concentration finale en AV n'est pas corrélée à la concentration finale en glycérol pour l'espèce *T. delbrueckii* (coefficient de corrélation = -0,2942 , P = 0,6277) mais semble corrélée pour l'espèce *S. cerevisiae* (coefficient de corrélation = 0,946), bien que le faible nombre de valeurs ne permette pas de dire que cette corrélation soit significative (P = 0,3243) (figure 41).

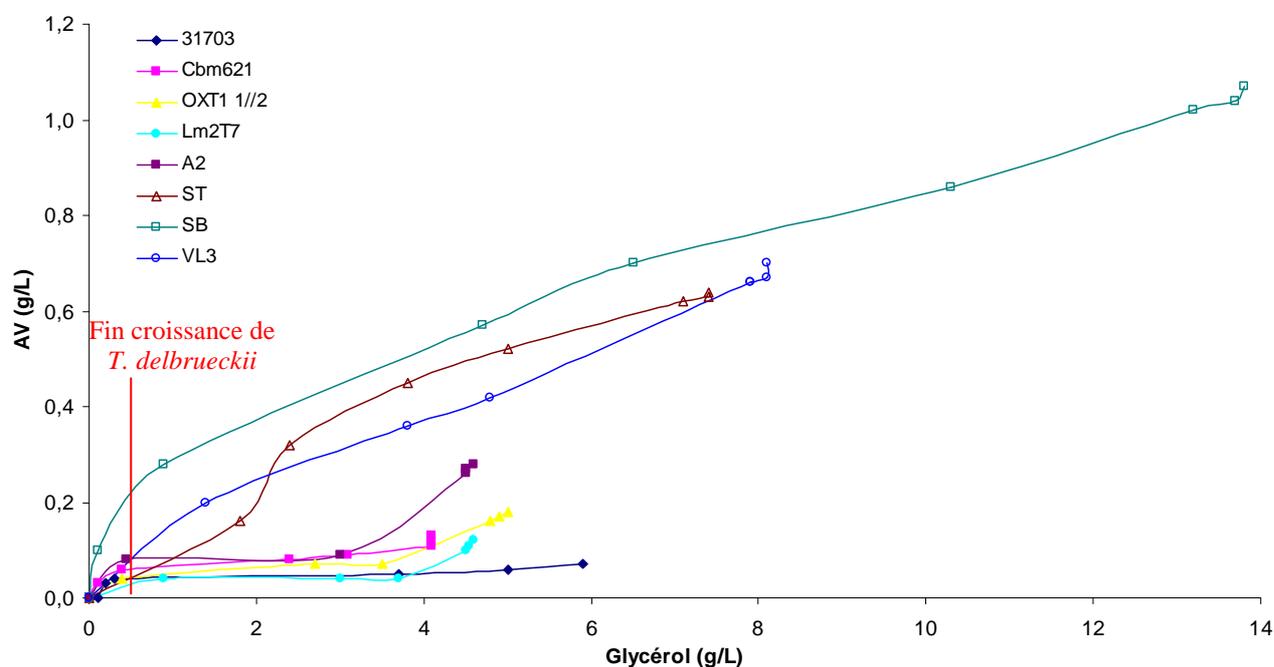


Figure 40 : Production d'AV en fonction de la production de glycérol pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et de 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3).

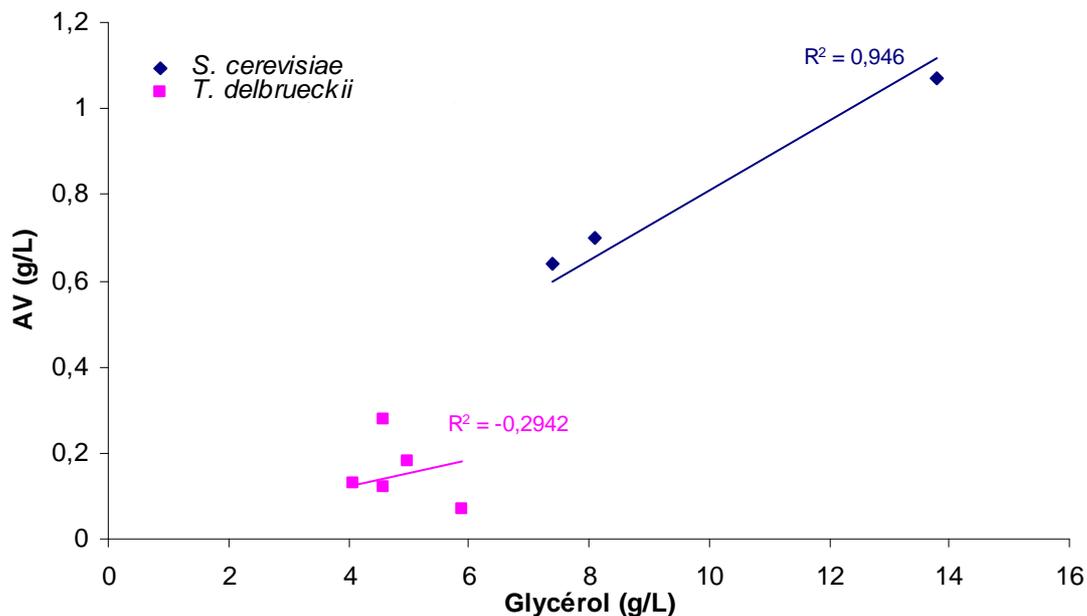


Figure 41 : Corrélation entre la concentration finale en AV et la concentration finale en glycérol pour les cultures pures de 5 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621, OXT1 1//2, Lm2T7 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3).

Les résultats de cette expérience confirment et complètent ceux déjà établis, à savoir que la production globale d'AV et de glycérol par l'espèce *T. delbrueckii* est inférieure à celle de *S. cerevisiae*, que ce soit en fin de croissance cellulaire, à 5 % vol. éthanol formés ou en fin de réaction. Ces faibles productions, par rapport à l'espèce *S. cerevisiae*, ne sont pas expliquées par un flux spécifique plus faible de l'espèce *T. delbrueckii* mais plutôt par une plus faible production d'AV et de glycérol par gramme de biomasse. De plus, la production de biomasse est plus faible pour l'espèce *T. delbrueckii*, ce qui renforce la différence entre les 2 espèces lorsque l'on compare leurs concentrations dans le milieu en fin de réaction.

De plus, si la production d'AV semble couplée à la production de glycérol pendant toute la fermentation, pour les 3 souches de *S. cerevisiae*, il n'en est pas de même pour *T. delbrueckii*. En effet, pour cette espèce, la production d'AV semble liée à la production de glycérol uniquement en début de fermentation (pendant la phase de croissance) et en fin de réaction, vraisemblablement durant la phase de déclin. La concentration finale en AV n'est donc pas corrélée à la concentration finale en glycérol pour l'espèce *T. delbrueckii* (contrairement à *S. cerevisiae*).

Aussi, si nous avons pu apporter une explication à la faible production d'acidité volatile et de glycérol de l'espèce *T. delbrueckii* au cours de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques, il nous a semblé intéressant d'étudier l'adaptation de cette espèce au moment de son inoculation, dans un milieu très riche en sucres. En effet, si sa production d'AV est faible en début de réaction, nous venons de voir que cette production semblait couplée à la production de glycérol. Chez l'espèce *S. cerevisiae*, où le mécanisme de réponse au stress est bien connu, la production d'acidité volatile est liée à une surproduction de glycérol, composé synthétisé pour contre-balancer la pression osmotique.

2 Etude d'un choc osmotique

Le but de cette expérience est d'évaluer et comparer, au cours des 10 premières heures qui suivent un choc osmotique, la concentration d'AV et de glycérol du milieu en fermentation ainsi que la production intracellulaire en glycérol des espèces *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*. Cette expérience a été réalisée à 24°C en fermenteur (avec suivi automatique du dégagement du CO₂), en duplicata, dans le milieu synthétique MS ajusté à 350 g/L de sucres. Trois souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3) ont été utilisées au cours de cette expérience. L'évolution de la concentration cellulaire, ainsi que de la biomasse (exprimée en g/L de matière sèche), ont également été suivies au cours de l'expérience.

Durant les 10 premières heures qui ont suivi l'introduction des levures dans le milieu, nous n'avons pas observé de croissance cellulaire, ni de mortalité. Cependant, une augmentation du volume cellulaire de la population est apparue après environ 6h pour les souches de *S. cerevisiae* et environ 8h pour les souches de *T. delbrueckii*. Malgré l'utilisation de l'installation automatisée, le dégagement de CO₂ n'a pu être mesuré car nous étions dans la phase de saturation du milieu en CO₂ (sans perte de poids du fermenteur).

Les quantités d'AV et de glycérol externes ramenées à la matière sèche ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche) en fonction du temps, pour les 2 espèces, sont présentées sur la figure 42. On peut noter qu'après 5 heures de contact, les rendements sont inférieurs pour l'espèce *T. delbrueckii*. De même, après 10 heures de réaction, les productions moyennes d'AV et de glycérol ramenées à la matière sèche sont significativement plus faibles pour l'espèce *T. delbrueckii*. En effet, elles sont pour l'AV de $45 \pm 11,7$ et $74,7 \pm 9,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche et pour le glycérol de 194 ± 100 et 483 ± 171 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche pour respectivement *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*.

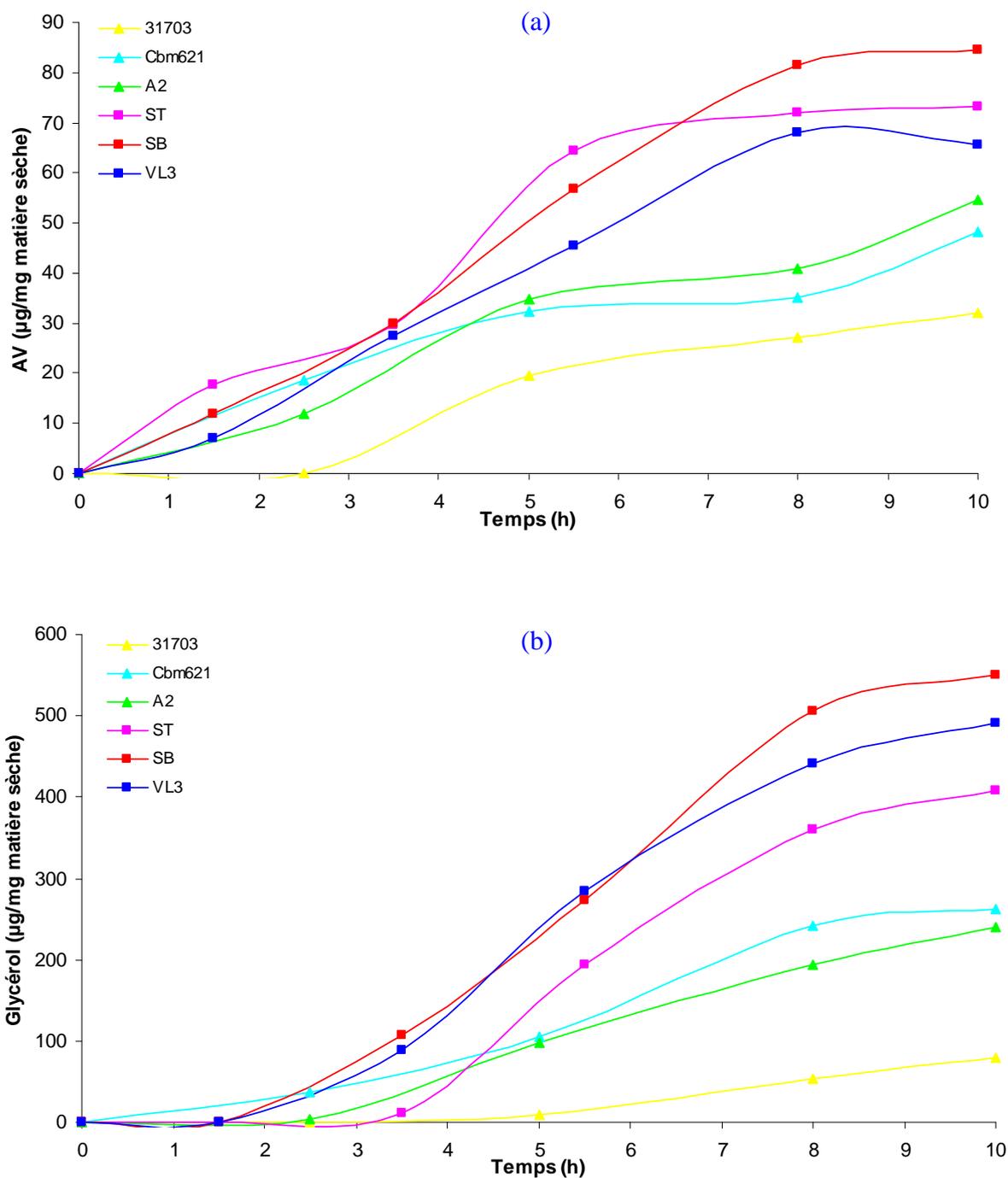


Figure 42 : Quantités d'AV (a) et de glycérol (b) par mg de matière sèche en fonction du temps pour les cultures pures de 3 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3). Moyenne de 2 répétitions. Ecart type maximal $\pm 10\%$.

La quantité de glycérol présente à l'intérieur des cellules a également été évaluée. Pour comparer les 2 espèces de levures, afin d'estimer au mieux la concentration à l'intérieur des cellules, nous avons choisi d'exprimer la quantité de glycérol interne ramené au volume cellulaire de la population et non à la quantité de matière sèche. Les volumes cellulaires des populations ont été calculés en prenant en considération, le nombre et la taille des cellules des populations mesurées par le compteur à particules. L'évolution de la quantité de glycérol interne par volume cellulaire pour les souches des 2 espèces est représentée sur la figure 43. La concentration de glycérol à l'intérieur des cellules semble similaire pour les 2 espèces. Seule la souche *S. cerevisiae* SB, levure la plus forte productrice d'AV et de glycérol utilisée, présente une concentration de glycérol interne plus importante que les autres souches.

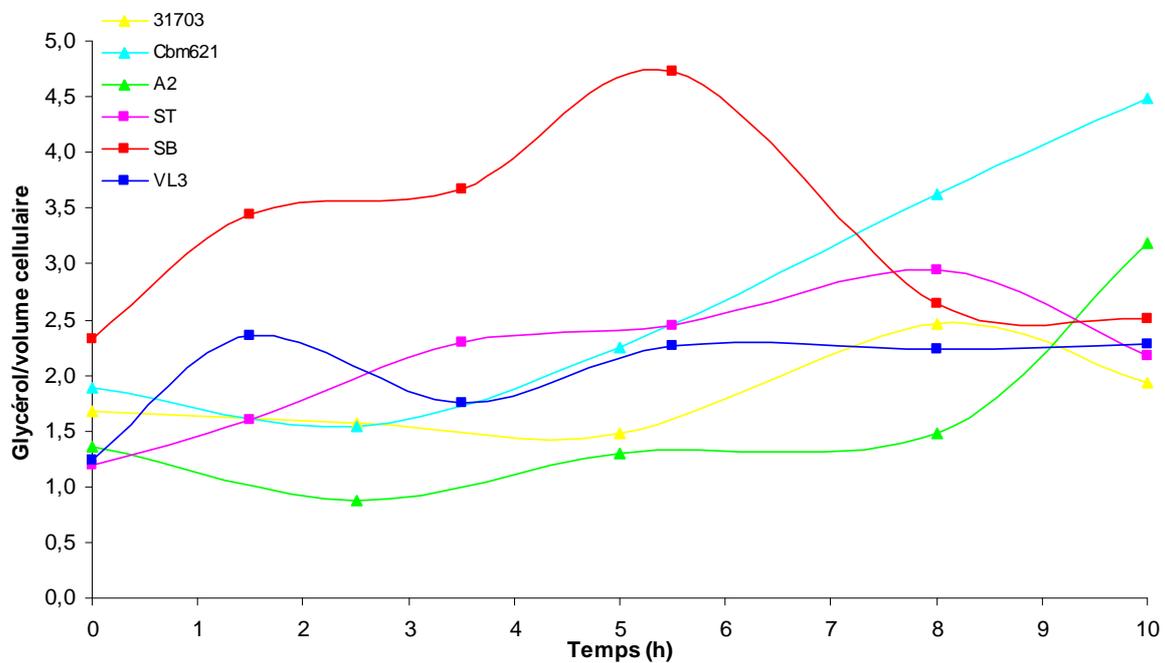


Figure 43 : Evolution de la quantité de glycérol interne par unité de volume cellulaire ($\mu\text{g}/\mu\text{m}^3 \times 10^9$) en fonction du temps pour les cultures pures de 3 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3). Moyenne de 2 répétitions. Ecart type maximal $\pm 10\%$.

Afin d'estimer s'il existe toujours un couplage entre l'accumulation du glycérol à l'intérieur de la cellule et le transport du glycérol vers l'extérieur de la cellule, nous avons comparé la quantité de glycérol interne à la quantité de glycérol du milieu extérieur. La quantité de glycérol interne en fonction de la quantité de glycérol externe est ainsi représentée sur la figure 44. Ces 2 quantités sont exprimées en μg de glycérol par mg de matière sèche. On peut voir sur cette figure que, pour l'espèce *S. cerevisiae*, la quantité de glycérol interne augmente dès l'introduction des levures dans le milieu sans enrichissement du milieu extérieur. Il

semble donc que l'espèce *S. cerevisiae* accumule le glycérol en bloquant son transport vers l'extérieur de la cellule. Ce blocage lui permet d'augmenter rapidement sa concentration en glycérol interne et ainsi de mieux résister à la pression osmotique élevée du milieu extérieur. Ce phénomène a déjà été mis en évidence chez *S. cerevisiae* par de nombreux auteurs (Tamàs *et al.*, 1999, 2003 ; Thorsen *et al.*, 2006). Dans une deuxième phase, lorsque la concentration en glycérol interne est proche de 3,5 µg/mg de matière sèche, il y a toujours une accumulation du glycérol à l'intérieur de la cellule mais une partie du glycérol formé est excrétée de la cellule (augmentation de la concentration en glycérol externe). Dans une troisième phase, la quantité de glycérol interne diminue alors que la quantité de glycérol extérieur continue d'augmenter. Pour l'espèce *T. delbrueckii*, il semblerait qu'il n'y ait pas de blocage du glycérol à l'intérieur de la cellule, pour augmenter rapidement sa concentration interne, mais que le transport du glycérol vers l'extérieur soit actif dès le choc osmotique, contrairement à *S. cerevisiae*. Après quelques heures de contact, il y a accumulation de glycérol à l'intérieur des cellules et à l'extérieur de la cellule sauf pour la souche 31703. Ces résultats sont des éléments supplémentaires permettant de dire que la réponse au stress osmotique de l'espèce *T. delbrueckii* est différente de celle de *S. cerevisiae*. Une hypothèse pourrait être qu'une concentration interne en glycérol faible soit suffisante pour résister à la forte pression osmotique pour l'espèce *T. delbrueckii* qui n'a donc pas besoin de bloquer le transport du glycérol vers l'extérieur de la cellule.

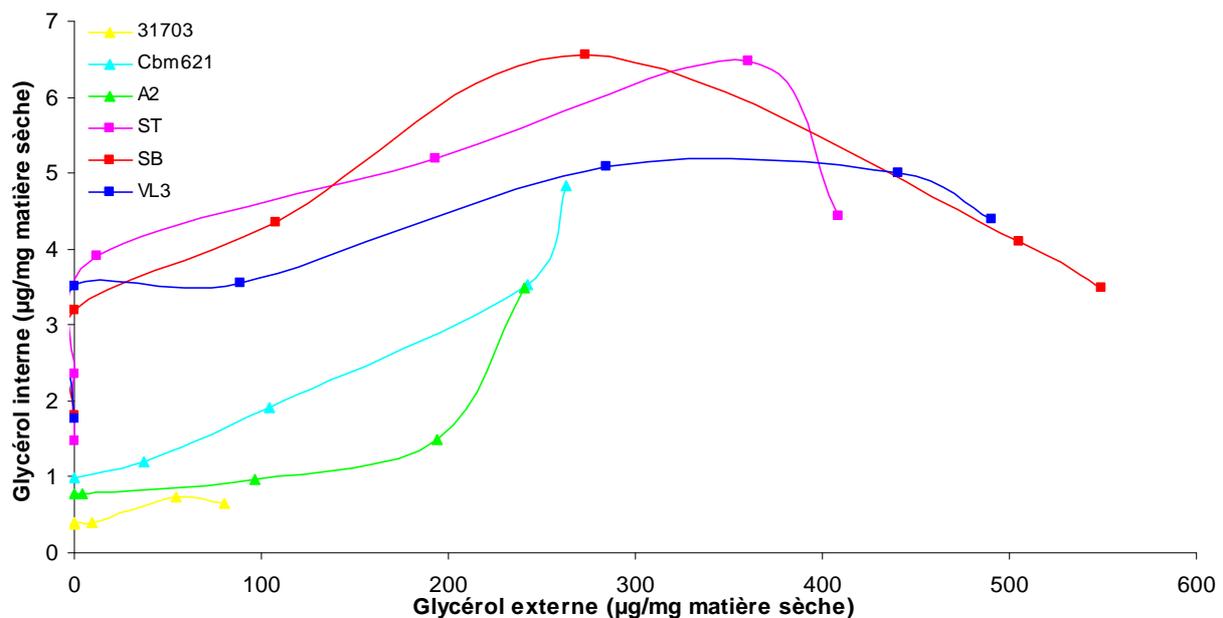


Figure 44 : Evolution de la quantité de glycérol interne en fonction de la production de glycérol externe pour les cultures pures de 3 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3). Moyenne de 2 répétitions. Ecart type maximal $\pm 10\%$.

La figure 45, présentant l'évolution de la production d'AV en fonction du glycérol externe, permet également d'appuyer l'hypothèse d'un blocage du glycérol chez *S. cerevisiae*, contrairement à *T. delbrueckii*. En effet, la quantité d'AV par gramme de matière sèche augmente rapidement pour l'espèce *S. cerevisiae* au contact du milieu très sucré, alors que la production de glycérol externe n'augmente pas au cours des premiers prélèvements. L'augmentation de la quantité d'AV pour l'espèce *S. cerevisiae* semble liée à l'augmentation rapide de la quantité interne de glycérol (figure 46) et non à l'accumulation du glycérol dans le milieu. Puis, il y a un couplage entre la quantité d'AV et la quantité en glycérol extérieur. Pour *T. delbrueckii*, la production d'AV semble toujours liée à celle du glycérol extérieur (figure 45). De plus, il ne semble pas qu'il y ait un couplage entre l'accumulation du glycérol interne et l'accumulation de l'AV durant les premières heures de la réaction, contrairement à l'espèce *S. cerevisiae* (figure 46).

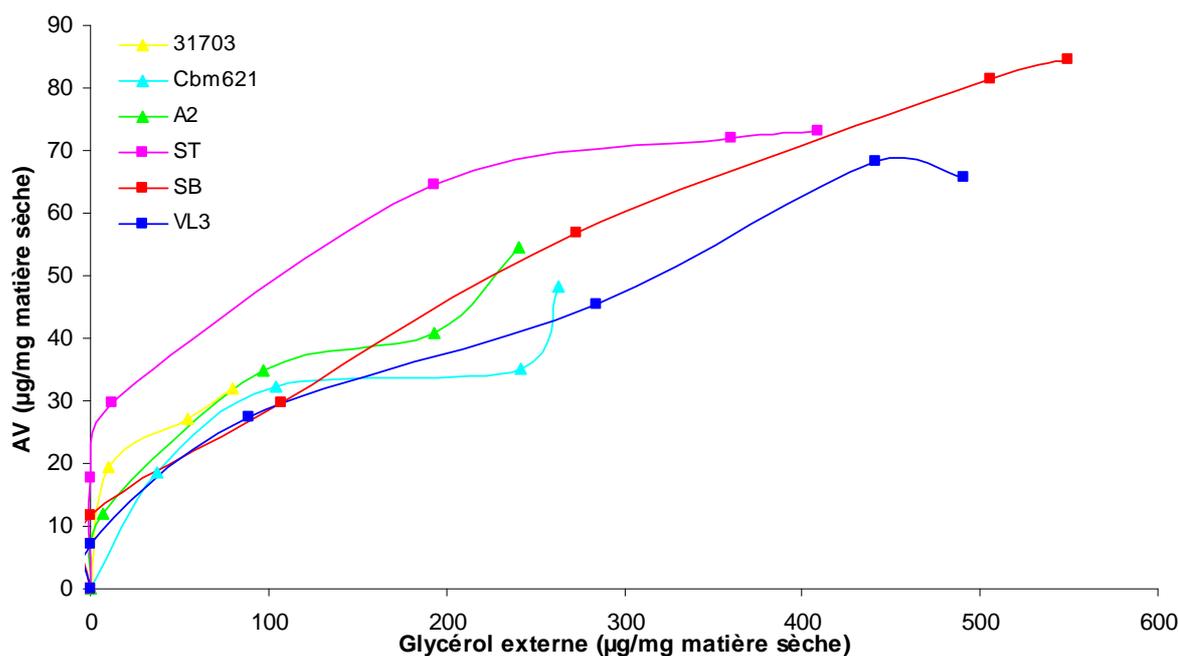


Figure 45 : Evolution de la quantité d'AV en fonction de la quantité de glycérol externe pour les cultures pures de 3 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3). Moyenne de 2 répétitions. Ecart type maximal $\pm 10\%$.

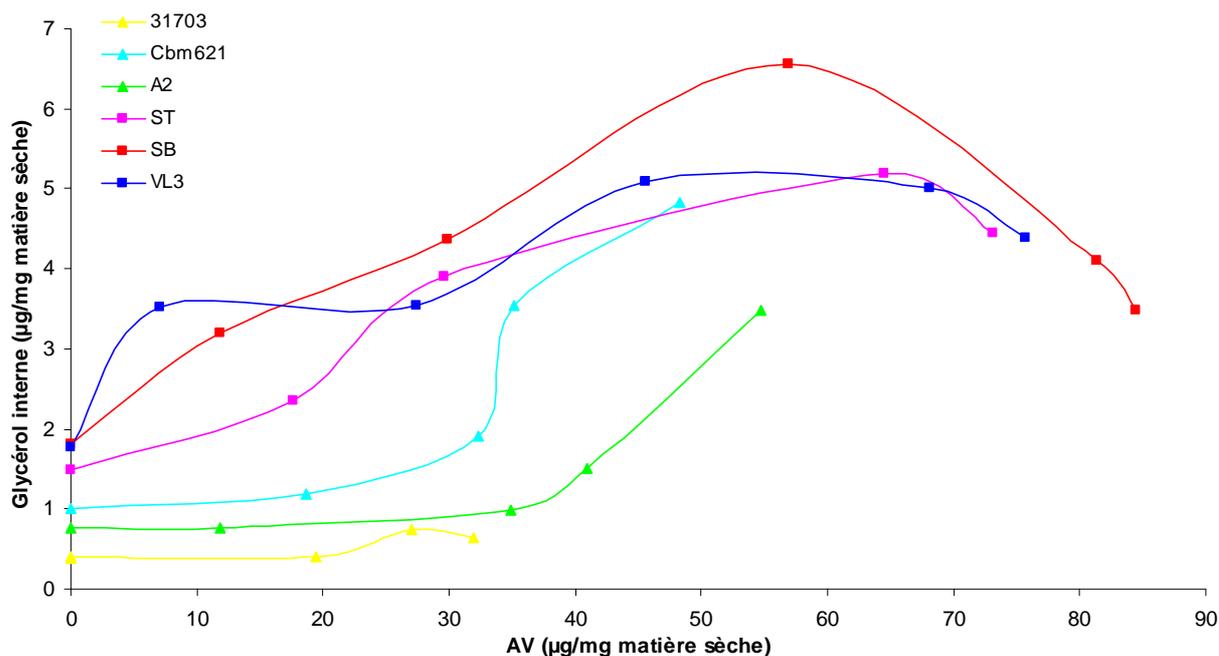


Figure 46 : Evolution de la quantité glycérol interne en fonction de la quantité d'AV pour les cultures pures de 3 souches de *T. delbrueckii* (31703, Cbm621 et A2) et 3 souches de *S. cerevisiae* (ST, SB et VL3). Moyenne de 2 répétitions. Ecart type maximal $\pm 10\%$.

Cette expérience a permis de mettre en évidence un comportement au stress osmotique de l'espèce *T. delbrueckii* différent de celui de *S. cerevisiae*. Chez cette dernière, après 5h de contact avec une matrice riche en sucres, ses rendements AV/matière sèche et glycérol externe/matière sèche, sont plus élevés que chez *T. delbrueckii*. Si l'on regarde au niveau intracellulaire, il y a, chez *S. cerevisiae* une accumulation du glycérol interne dès la première heure, par blocage du transport du glycérol vers l'extérieur, pour contrebalancer la pression osmotique, contrairement à *T. delbrueckii*. Cette accumulation de glycérol provoque une augmentation rapide de l'AV dans le milieu de fermentation que l'on ne retrouve pas chez *T. delbrueckii*. Pour compléter cette étude, il faudrait également doser d'autres molécules telles que le tréhalose, d'autres polyols que le glycérol tels que l'arabitol, le mannitol, l'erythritol et le xylitol, présents à l'intérieur de la cellule et pouvant aider la levure à résister au stress osmotique. Selon Hernandez-Lopez *et al.* (2003), le principal polyol osmorégulateur chez *T. delbrueckii* est bien le glycérol, comme chez *S. cerevisiae*, mais d'autres polyols ont également été trouvés en faibles quantités comme l'arabitol, le galactitol et le méthyl-galactitol. Par ailleurs, Lucca *et al.* (1999) ont montré que l'arabitol est accumulé à l'intérieur de la cellule de *T. delbrueckii* à des concentrations cellulaires plus importantes que chez *S. cerevisiae* au cours d'un stress osmotique en conditions de panification. Enfin, selon Hernandez-lopez *et al.* (2003), le glycérol pourrait ne pas jouer de rôle dans la balance

d'oxydoréduction de la levure et être uniquement impliqué dans l'ajustement osmotique chez *T. delbrueckii*. D'autres auteurs ont émis la même hypothèse en étudiant la réponse au stress osmotique d'une autre levure non-*Saccharomyces*, génétiquement proche de *T. delbrueckii* : *Zygosaccharomyces rouxii* (Shen *et al.*, 1999).

En conclusion générale, on peut dire que l'espèce *T. delbrueckii* produit moins d'AV et de glycérol que l'espèce *S. cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique de moûts riches en sucres. Cette spécificité est due à la fois à une faible production d'AV et de glycérol par gramme de biomasse, une faible production de biomasse et enfin à une réponse au stress osmotique différente de *S. cerevisiae* et engendrant une production moindre d'AV et de glycérol dans le milieu.

IV Co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae*

Notre étude, sur la caractérisation de l'espèce *T. delbrueckii* en conditions œnologiques, nous a permis de mettre en évidence que, malgré un pouvoir alcoogène peu élevé, cette espèce de levure présente un métabolisme intéressant, caractérisé par une fermentation « pure ». Cependant, sa production d'éthanol modérée entraîne la présence indésirable de sucres résiduels dans le milieu, en fin de fermentation alcoolique, si cette dernière est réalisée intégralement par cette espèce. Il est donc nécessaire, dans la pratique, de l'associer à l'espèce *S. cerevisiae* pour achever les fermentations alcooliques. Afin de mettre au point un protocole d'inoculation mixte, permettant à la fois l'expression du métabolisme spécifique de l'espèce *T. delbrueckii* et l'achèvement de la fermentation alcoolique par l'espèce *S. cerevisiae*, nous avons réalisé plusieurs essais en co-inoculations. Les souches *T. delbrueckii* retenues pour ces essais ont été sélectionnées d'après notre étude sur la caractérisation de l'espèce. Nous avons choisi les souches qui présentaient des phases de latence courtes, des vitesses en début de fermentation élevées, des faibles productions d'AV et un pouvoir alcoogène supérieur à 8 % vol. éthanol. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des moûts liquoreux car la réduction de la production d'acidité volatile est une réelle préoccupation des vinificateurs de cette filière. Puis, nous avons élargi notre domaine expérimental à l'élaboration des vins blancs secs et rosés. Certaines expériences ont été réalisées en laboratoire, d'autres à l'échelle industrielle.

1 Moût liquoreux

Les moûts issus de raisins botrytisés de la région de Bordeaux sont naturellement très riches en sucres. En effet, leurs concentrations sont généralement voisines de 350 g/L. En réponse à ce stress, l'espèce *S. cerevisiae* produit des quantités importantes d'AV comprises entre 0,85 et 0,98 g/L d'acide acétique. Cependant, lors des années exceptionnelles (millésimes 2003 ou 2009) les concentrations en sucres des moûts peuvent dépasser les 400 g/L et la production d'AV par l'espèce *S. cerevisiae* peut alors dépasser la limite légale autorisée de 1,5 g/L d'acide acétique (réglementation OIV). Les professionnels sont donc très attentifs à la quantité d'AV dans leurs vins. Par ailleurs, une autre préoccupation lors de l'élaboration de ce type de vin, est de limiter la dose de SO₂ servant à stopper la fermentation, étape appelée mutage. En effet, lorsqu'un équilibre éthanol/sucres résiduels d'environ 13-14% vol./110g/L est atteint, l'activité des levures est stoppée par un ajout de 18 à 25 g/hL de SO₂. La quantité de SO₂ à additionner pour muter le moût est calculée de sorte que la fraction libre du SO₂ (seule fraction active vis-à-vis des levures), soit d'environ 50 mg/L après combinaison. Or, les moûts liquoreux fermentés contiennent de nombreux composés qui combinent le SO₂ : 5-oxofructose, dihydroxyacétone, γ et δ -gluconolactone, acétaldéhyde, acides pyruvique et 2-oxoglutarique, glyoxal, méthylglyoxal et glucose (Barbe., 2000, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). L'origine de ces composées est expliquée par la présence de *Botrytis cinerea* et de bactéries acétiques au niveau de la baie mais également par le métabolisme de la levure. Le « pouvoir de combinaison » du moût est variable selon les lots. Il est donc nécessaire, avant de réaliser le mutage d'un lot, d'en estimer le pouvoir de combinaison sur de petits volumes. Le principe est simple puisqu'il consiste à ajouter dans le moût des concentrations croissantes en SO₂ et à mesurer la concentration en SO₂ libre résiduelle. La dose de SO₂ à utiliser est alors calculée pour obtenir les 50 mg/L de SO₂ libre souhaités. Lors de nos essais en chai, ce pouvoir de combinaison sera aussi discuté, en plus de la production d'AV.

La mise au point d'un protocole d'inoculation mixte s'appuie sur des travaux antérieurs réalisés à la faculté d'œnologie de Bordeaux sur l'élaboration des vins liquoreux (Bely *et al.*, 2008). Ces auteurs ont obtenu, en réalisant des co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* ST (introduction simultanée des deux types de levure), des réductions importantes de la production d'acidité volatile, soit jusqu'à 55% avec la souche *T. delbrueckii* 31703, par rapport à une inoculation classique avec uniquement la souche *S. cerevisiae* ST. Outre la réduction d'AV, les co-inoculations ont permis d'atteindre le degré alcoolique de 14 % vol. désiré au moment du mutage. Selon ces mêmes auteurs, une inoculation séquentielle, avec

ajout de la souche *S. cerevisiae* cinq jours après inoculation de la souche *T. delbrueckii*, est moins performante puisqu'elle a conduit à une production d'AV plus importante que la modalité en co-inoculation et a engendré un arrêt précoce de la fermentation. Lors de nos travaux, nous avons donc privilégié l'inoculation mixte de type co-inoculation plutôt que l'inoculation séquentielle des deux espèces. Par ailleurs, notre étude sur la caractérisation de l'espèce *T. delbrueckii* nous a permis de voir que sur milieu synthétique MS et pour des concentrations cellulaires d'inoculum identiques, ses durées de phases de latence sont légèrement plus longues que celles de l'espèce *S. cerevisiae*. De plus, malgré une population maximale souvent supérieure à *S. cerevisiae* lorsqu'elle est exprimée en nombre de cellules/mL, cette population est inférieure lorsqu'elle est exprimée en terme de biomasse (poids des cellules en gramme de matière sèche par litre) ou en volume cellulaire fermentaire. Aussi, il est indispensable, lors de la réalisation de co-inoculations, de favoriser le développement de l'espèce *T. delbrueckii* en l'introduisant à une concentration supérieure à celle de *S. cerevisiae*.

Par ailleurs, peu de dénombrements des populations levuriennes ont été effectués lors de nos expériences réalisées sur des moûts liquoreux et présentées ci-dessous. En effet, ce type de moût présente deux inconvénients, une quantité de bourbes c'est-à-dire de particules en suspension très importante (turbidité > 500 NTU) rendant impossible le dénombrement des levures à l'aide du compteur à particules et la présence d'une population de levures non négligeable dans le moût avant inoculation, qui complique le comptage des 2 populations de levures expérimentées. Par contre, un contrôle d'implantation systématique des souches de levures inoculées a été réalisé.

1.1 Effet du rapport d'inoculation

Le comportement de 7 souches de *T. delbrueckii* (OXT1 1//2, Lm2T7, Lm1T20, 31703, OXT1 18//33, Cbm621 et Lm1T10) a été évalué en co-inoculation à 24°C avec la souche *S. cerevisiae* ST sur un moût liquoreux. Les souches de *T. delbrueckii*, testées dans cet essai, ont été sélectionnées d'après les résultats obtenus sur milieu synthétique MS ajusté à 350 g/L de sucres, selon trois critères principaux : une faible production d'acidité volatile, une phase de latence courte, une vitesse de fermentation élevée en début de fermentation et, dans une moindre mesure, une production d'éthanol importante lors de leur fermentation « pure » (données non présentées). La souche commerciale *S. cerevisiae* Zymaflore ST (Laffort, France) choisie est largement utilisée par les professionnels de cette filière car elle est très peu

productrice d'AV et de sous-produits impliqués dans la combinaison du SO₂ (Erasmus *et al.*, 2004 ; Masneuf et Dubourdiou, 2000). Le milieu utilisé dans cette expérience est un moût botrytisé de Sémillon congelé dont la population de levures est de 10⁵ cellules/mL après décongélation. Sa concentration initiale en sucres est de 350 g/L (soit 20% vol. éthanol potentiels) et sa concentration en azote assimilable a été ajustée à 200 mg/L avec du thiazote. Le but de cette première expérience, réalisée au laboratoire en triplicata dans des bouteilles de 250 mL, est de comparer les co-inoculations obtenues avec les différentes souches de *T. delbrueckii* pour une même souche de *S. cerevisiae* et d'évaluer l'effet du rapport d'inoculation sur la conduite de la fermentation. Deux rapports d'inoculation *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* ont ainsi été testés : 10/1 et 20/1 avec une concentration cellulaire de *T. delbrueckii* toujours supérieure à celle de *S. cerevisiae* et fixée à 5.10⁶ cellules viables/mL. La culture pure de *S. cerevisiae* a été inoculée à 10⁶ cellules viables/mL. Dans toutes ces expériences, le moût a été inoculé à partir de pré-cultures de 24 h à 24°C réalisées sur le même milieu de fermentation dilué au demi avec de l'eau. Le suivi de la fermentation alcoolique a été réalisé grâce à une mesure du poids des bouteilles.

Les suivis du dégagement de CO₂, pour les expériences en cultures mixtes avec le rapport d'inoculation 10/1 et pour la culture pure *S. cerevisiae* sont présentés sur la figure 47. Toutes les modalités ont atteint les 22,5g de CO₂ dégagé par bouteille correspondant au degré éthanol désiré de 14 % vol. La présence de *T. delbrueckii* et de la souche *S. cerevisiae* ST a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la fermentation pour toutes les modalités. Les durées de phase de latence sont similaires pour les co-inoculations et sont plus courtes de quelques heures par rapport à celle de la culture pure *S. cerevisiae*. Ceci est dû en partie au fait que les modalités en co-inoculations ont étéensemencées avec un plus grand nombre de levures (5.10⁶ + 5.10⁵ cellules viables/mL) que la modalité ST pure (10⁶ cellules viables/mL). Par ailleurs, la modalité pure a atteint les 14% vol. éthanol désirés en 232 h soit bien avant les co-inoculations beaucoup plus lentes : entre 380 et 639 h. Les vitesses de fermentation des co-inoculations sont très différentes selon les souches de *T. delbrueckii* utilisées. La grande variabilité intraspécifique pour ce paramètre, mise en évidence lors des fermentations pures sur milieu synthétique, semble donc s'appliquer également dans le cas des co-inoculations. Les co-inoculations avec les souches 31703 et Cbm621 permettent d'atteindre les 14% vol. éthanol désirés beaucoup plus rapidement qu'avec les autres souches.

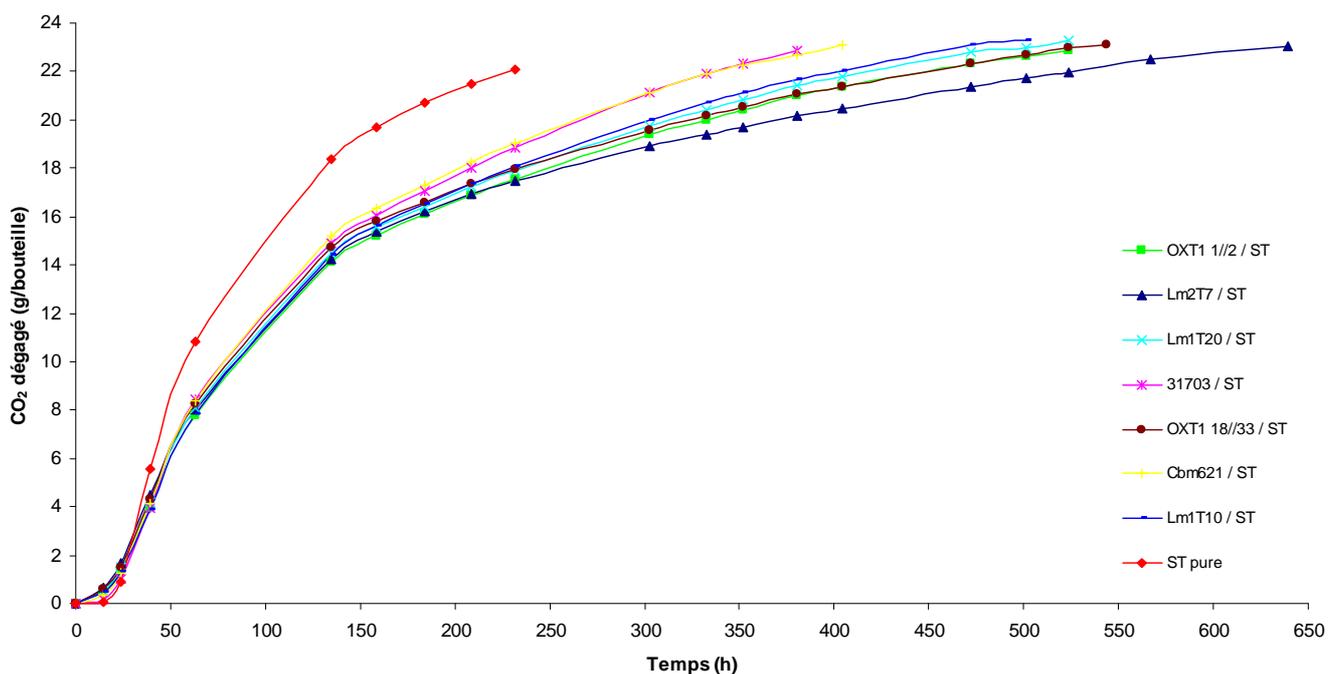


Figure 47 : Evolution du dégagement de CO₂ au cours du temps pour les 7 co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* au rapport 10/1 et la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max $\pm 0,6$.

Les cinétiques de fermentations obtenues lors de co-inoculations au rapport 20/1 ont mis en évidence qu'il n'y a pas d'effet significatif sur la durée de phase de latence en comparaison avec le rapport 10/1, mais que ce rapport influence fortement les durées de fermentations (tableau 16). Les souches de *T. delbrueckii*, dont les fermentations en co-inoculation au rapport 10/1 sont les plus rapides, sont également les souches présentant les co-inoculations les plus rapides au rapport 20/1.

Tableau 16 : Durées de phase de latence et de la fermentation pour les 7 co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* ST aux rapports 10/1 et 20/1 et la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max : durée de la phases de latence ± 1 , durée de la fermentation ± 10 .

		Durée de fermentation (heures)							
		ST pure	OXT1 1//2 / ST	Lm2T7 / ST	Lm1T20 / ST	31703 / ST	Cbm621 / ST	OXT1 18//33 / ST	Lm1T10 / ST
Rapport 10/1	232	524	639	524	380	404	543	501	
Rapport 20/1		807	842	736	639	524	807	567	

		Durée de la phase de latence (heures)							
		ST pure	OXT1 1//2 / ST	Lm2T7 / ST	Lm1T20 / ST	31703 / ST	Cbm621 / ST	OXT1 18//33 / ST	Lm1T10 / ST
Rapport 10/1	19	8	6	8	10	8	6	7	
Rapport 20/1		8	6	8	11	9	7	8	

La figure 48 illustre ces résultats en représentant les cinétiques obtenues avec les souches 31703 et Lm1T20. Dans ce cas, les durées de fermentation (pour atteindre 14 % vol. éthanol) des co-inoculations avec un rapport 10/1 sont de 380 et 524 h alors qu'elles passent à 639 et 736 h avec le rapport 20/1 pour 31703 et Lm1T20 respectivement.

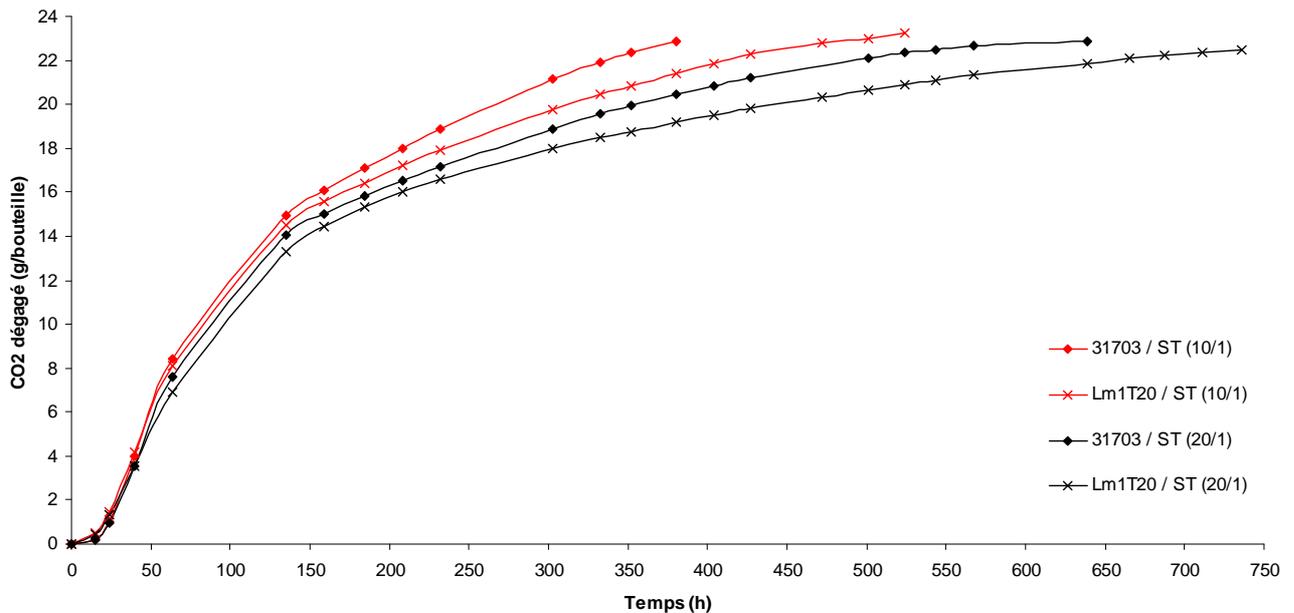


Figure 48 : Evolution du dégagement de CO₂ au cours du temps pour les co-inoculations avec *T. delbrueckii* 31703 et Lm1T20 aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et pour la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max $\pm 0,6$.

Les modalités réalisées avec les rapports 10/1 et 20/1 sont différentes uniquement pour leurs concentrations en *S. cerevisiae* plus faibles dans le rapport 20/1 : $2,5 \cdot 10^5$ cellules viables/mL que pour le rapport 10/1 : $5 \cdot 10^5$ cellules viables/mL, la concentration des souches de *T. delbrueckii* étant fixe : $5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Nos résultats montrent que la concentration initiale en *S. cerevisiae* influence la durée de fermentation sans modifier la durée de la phase de latence. On peut penser que, plus sa concentration est faible au départ, plus la souche ST rencontre des difficultés à se développer (croissance plus lente et population maximale plus faible) ce qui se traduit pas des fins de fermentations plus languissantes. Cette compétition avec l'espèce *T. delbrueckii* a déjà été décrite par Bely *et al.* (2008) qui ont comparé, pour un couple de souches donné, la population cellulaire maximale atteinte en fonction du rapport d'inoculation initial entre les espèces. La fermentation serait alors réalisée en partie par l'espèce *T. delbrueckii*, caractérisée en culture pure sur milieux synthétiques par des vitesses

de fermentation inférieures à *S. cerevisiae*. Une des raisons pouvant expliquer un plus faible développement de l'espèce *S. cerevisiae* pourrait être alors un manque d'azote assimilable. En effet, d'après nos résultats sur milieu synthétique, l'espèce *T. delbrueckii* est capable de consommer au cours de sa croissance l'intégralité des acides aminés et de l'azote ammoniacal du milieu. Les quantités d'azote assimilable retrouvées dans les vins sont reportées dans la figure 49. Les concentrations sont significativement plus faibles pour les co-inoculations avec le rapport 10/1 que pour celles réalisées avec le rapport 20/1. En effet, les concentrations moyennes résiduelles pour les 7 co-inoculations avec les rapports 10/1 et 20/1 sont respectivement de 27,5 et 44 mg/L. Ces moyennes sont significativement plus élevées que la concentration d'azote assimilable résiduelle de la modalité *S. cerevisiae* pure qui est de 11 mg/L. Par ailleurs, il est important de noter que pour les co-inoculations, les 2 concentrations les plus faibles sont retrouvées pour les 2 modalités présentant les durées de fermentation les plus faibles, c'est-à-dire celles réalisées avec les souches 31703 et Cbm621 au rapport 10/1. La concentration résiduelle est alors très proche de celles de *S. cerevisiae* pure. La présence d'azote résiduel dans les co-inoculations semble indiquer que la diminution des vitesses de fermentation n'est pas due, ou du moins pas entièrement, à la compétition pour l'azote bien qu'on puisse penser que les souches de *T. delbrueckii* aient rapidement consommé l'azote ammoniacal qui est une source très importante pour la croissance des *S. cerevisiae* puisqu'elle contribue à la synthèse de nombreux acides aminés. En effet, l'azote assimilable résiduel est constitué essentiellement d'acides aminés, l'azote ammoniacal ayant été entièrement consommé. Bely *et al.* (2008) et Ciani *et al.* (2006) ont également écarté l'hypothèse d'une inhibition de la croissance de *S. cerevisiae* par compétition pour l'azote après avoir constaté la présence d'azote résiduel en fin de fermentation pour les co-inoculations.

Une autre hypothèse, concernant une faible croissance de *S. cerevisiae*, serait une compétition pour d'autres facteurs de croissance comme la thiamine. En effet, nous avons mis en évidence, lors de la caractérisation de l'espèce *T. delbrueckii* sur milieu synthétique, qu'elle était capable de consommer rapidement de grosses quantités de thiamine. Cette hypothèse a déjà été émise par d'autres auteurs travaillant sur d'autres espèces de levures non-*Saccharomyces* (Bataillon *et al.*, 1996).

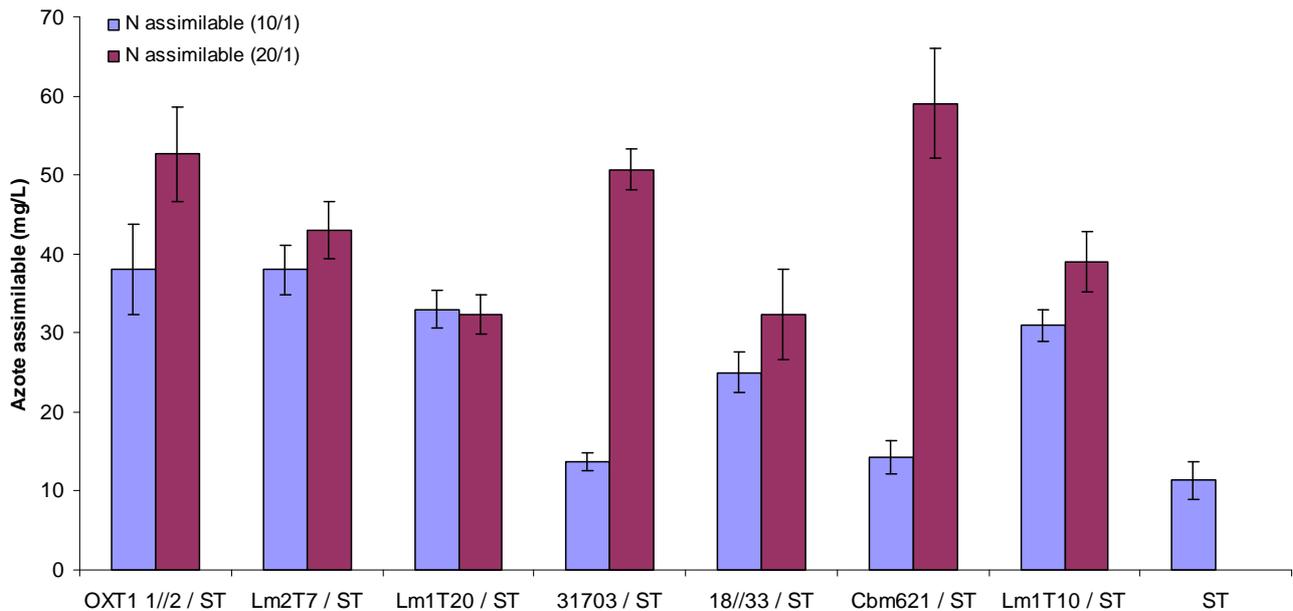


Figure 49 : Azote assimilable résiduel pour les 7 co-inoculations aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions.

La figure 50 présente les concentrations d'AV retrouvées dans les vins pour toutes les modalités. L'utilisation de *T. delbrueckii* en co-inoculation avec *S. cerevisiae* permet une réduction moyenne significative d'AV de 43% avec le rapport 10/1 et 38% avec le rapport 20/1 par rapport à la souche *S. cerevisiae* pure pourtant reconnue comme étant faiblement productrice d'AV. Les productions moyennes d'AV pour les 7 co-inoculations ne sont pas significativement différentes entre le rapport 10/1 et 20/1 bien que légèrement inférieures pour le premier rapport. Par contre, la variabilité intraspécifique observée pour la production d'AV par l'espèce *T. delbrueckii*, lors de fermentations pures sur milieux synthétiques, s'applique également en co-inoculation puisque la concentration d'AV finale est significativement différente pour les différentes co-inoculations au rapport 10/1 comme au rapport 20/1. En effet, pour le rapport 10/1 la réduction de l'AV par rapport au témoin *S. cerevisiae* est comprise entre 23 et 59 %. Les co-inoculations avec les souches 31703 et Cbm621 présentent les plus faibles productions d'AV et les cinétiques de fermentations les plus rapides.

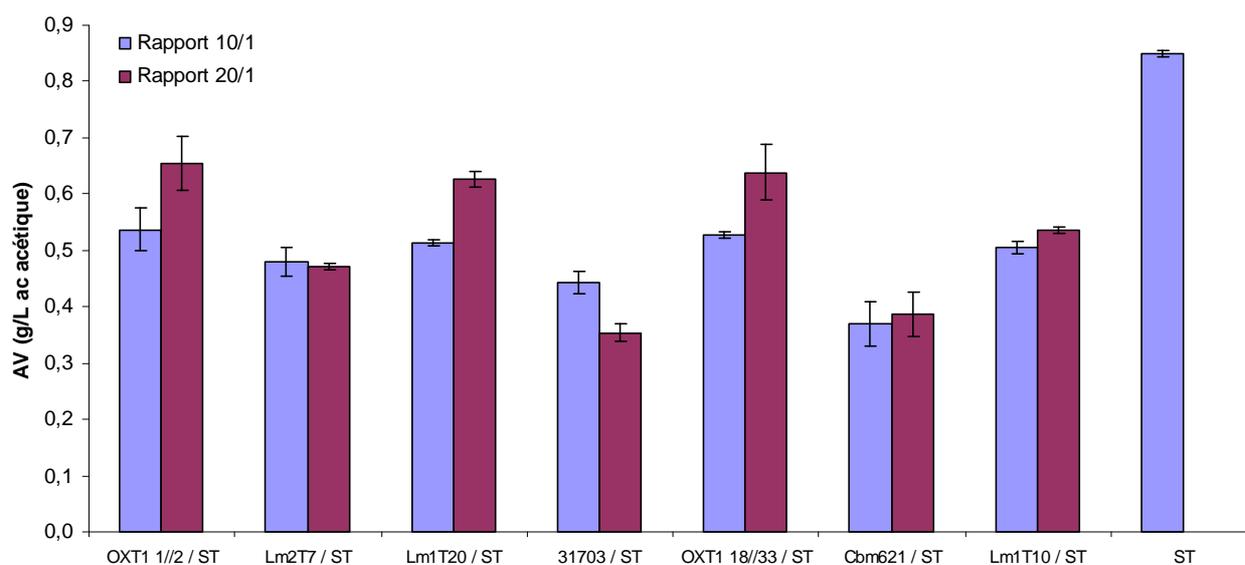


Figure 50 : Acidité volatile finale pour les 7 co-inoculations aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et la culture pure *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions.

La figure 51 présente la concentration en glycérol au moment de l'arrêt des fermentations pour les 7 co-inoculations réalisées avec les deux rapports et pour la fermentation pure avec *S. cerevisiae*. La production moyenne de glycérol est significativement plus faible pour le rapport 10/1 que pour le rapport 20/1, ce qui signifie que le rapport d'inoculation influence sa production. La production moyenne de glycérol pour les 7 co-inoculations est significativement supérieure à celle de la modalité avec *S. cerevisiae* pure pour les 2 rapports d'inoculation. Par ailleurs, la production de glycérol est significativement différente entre les co-inoculations pour les rapports 10/1 et 20/1.

En conclusion, les co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* réalisées avec 7 souches de *T. delbrueckii* différentes ont toutes permis une réduction significative d'AV jusqu'à 59% selon les souches par rapport à la modalité avec la souche *S. cerevisiae* ST pure couramment utilisée pour la vinification des moûts liquoreux en raison de sa faible production d'AV. Un rapport d'inoculation de 10/1 ou 20/1 n'a pas d'incidence sur la production d'AV. Ces résultats sont en accord avec Bely *et al.* (2008). Le rapport d'inoculation joue cependant un rôle important sur la durée de fermentation qui est plus courte lorsque la concentration initiale en *S. cerevisiae* est plus élevée (rapport 10/1). Les vitesses de fermentation des co-inoculations sont cependant toujours inférieures à celle de la *S. cerevisiae* pure. Ceci peut être

dû à une limitation de la croissance de *S. cerevisiae* par compétition avec *T. delbrueckii* introduit en plus forte concentration, pour les substrats comme l'azote ou la thiamine, comme cela a déjà été proposé par certains auteurs. Dans nos conditions, le rapport a également une influence sur la concentration d'azote résiduel et sur la concentration finale en glycérol. Par ailleurs, la grande variabilité intraspécifique observée au sein de l'espèce *T. delbrueckii*, lors de nos travaux sur sa caractérisation en fermentation pure, est également visible lors des co-inoculations avec *S. cerevisiae* pour les cinétiques de fermentations, la consommation d'azote et la production d'AV et de glycérol. Dans ces conditions, nous avons remarqué les performances particulièrement intéressantes des souches 31703 et Cbm621 dont les co-inoculations avec la souche *S. cerevisiae* ST permettent une réduction d'AV de plus de 50% et présentent les durées de fermentation les plus courtes.

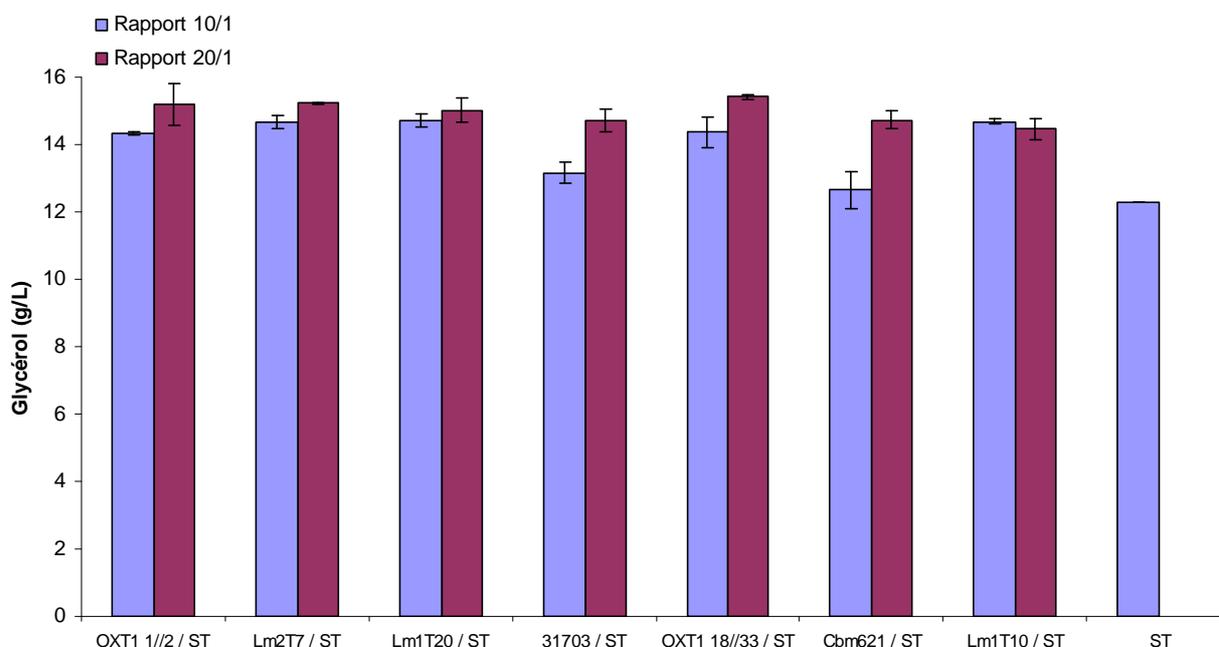


Figure 51 : Concentration finale en glycérol pour les 7 co-inoculations aux rapports d'inoculation 10/1 et 20/1 et la culture pure *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions.

1.2 Effet de l'azote sur la fermentation alcoolique

Selon Bely *et al.* (2003), la production d'AV chez la souche *S. cerevisiae* ST lors de la fermentation alcoolique des vins liquoreux dépend de la concentration initiale en azote du moût. Une concentration voisine de 190 mg N/L permet alors la plus faible production en AV.

Cependant, aucune information n'est disponible à notre connaissance sur les besoins en azote lors de co-inoculations non-*Saccharomyces* / *S. cerevisiae* en conditions hyperosmotiques.

Le but de cette expérience présentée ici est d'évaluer l'effet de la concentration en azote initial sur le déroulement de la fermentation alcoolique et la production d'AV en co-inoculation.

Cette expérience a été réalisée en laboratoire à partir d'un moût congelé de Sémillon botrytisé, contenant 358 g/L de sucres (20,5% vol. éthanol potentiel) et 75 mg/L d'azote assimilable et dont la concentration initiale en levures était de $1,8 \cdot 10^4$ cellules viables/mL après décongélation. Seules les souches *T. delbrueckii* 31703 et *S. cerevisiae* ST ont été utilisées au cours de cette expérience. Huit modalités ont été réalisées : six modalités en co-inoculations 31703 / ST avec des milieux ajustés à des concentrations croissantes d'azote assimilable par ajout de sulfate d'ammonium: 75, 120, 165, 210, 255 et 300 mgN/L et deux modalités *S. cerevisiae* pures avec les milieux ajustés à 75 et 210 mgN/L (modalité témoin ST). Le rapport 10/1 étudié plus haut a été retenu. Toutes les modalités ont étéensemencées à partir de pré-cultures de 24h à 24°C dans le milieu de fermentation dilué au demi avec de l'eau, et réalisées en duplicata. Pour cette expérience, nous avons dénombré la population totale par inoculation sur milieu « levure totale », sans différencier les populations de *T. delbrueckii* 31703 de *S. cerevisiae* ST et des autres populations indigènes.

Toutes les modalités ont atteint les 14% vol. éthanol désirés sauf la modalité 31703 / ST dans le milieu le moins riche en azote assimilable qui a conduit à un arrêt de fermentation à 12,5% vol. éthanol. Pour toutes les modalités en co-inoculation, la présence des 2 souches *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la réaction. L'azote assimilable est entièrement consommé pour toutes les modalités, sauf pour les 2 co-inoculations dans les milieux ajustés aux concentrations initiales les plus fortes où il reste environ 20 mg/L d'azote assimilable dus à la présence d'acides aminés résiduels.

Les cinétiques de fermentation des 8 modalités sont présentées sur la figure 52. Les durées de phase de latence des différentes co-inoculations sont similaires mais les durées de fermentations sont significativement différentes. La concentration en azote initiale a donc un effet significatif sur les cinétiques de fermentation des co-inoculations. En effet, plus la concentration en azote assimilable initiale est élevée plus la durée de fermentation pour atteindre les 14% vol. éthanol est courte. Ainsi, pour le milieu ajusté à 120 mg/L d'azote assimilable, la durée de fermentation est de 728 h alors qu'elle est de seulement 217 h pour le milieu ajusté à 300 mg/L. Le comportement est similaire pour les 2 modalités avec *S. cerevisiae* ST pure où les durées de fermentations sont respectivement de 728 et 246 h pour

les milieux ajustés respectivement à 75 et 210 mg/L d'azote assimilable. Les durées de fermentations des co-inoculations dans les 2 milieux avec les plus fortes concentrations en azote (255 et 300 mgN/L) sont inférieures à la durée de fermentation de la modalité témoin, c'est-à-dire de la souche *S. cerevisiae* pure dans le milieu à 210 mg/L d'azote assimilable. Cependant, pour une même concentration en azote initiale (210 et 75 mg/L), les durées de fermentations des modalités *S. cerevisiae* pure sont plus courtes que la modalité en co-inoculation pour le même milieu, malgré une durée de phase de latence plus longue de quelques heures. Cependant, il est important de noter que, pour le milieu à 210 mg/L d'azote assimilable, les durées de fermentation sont très proches entre la co-inoculation et *S. cerevisiae* pure soit respectivement 246 et 269 h.

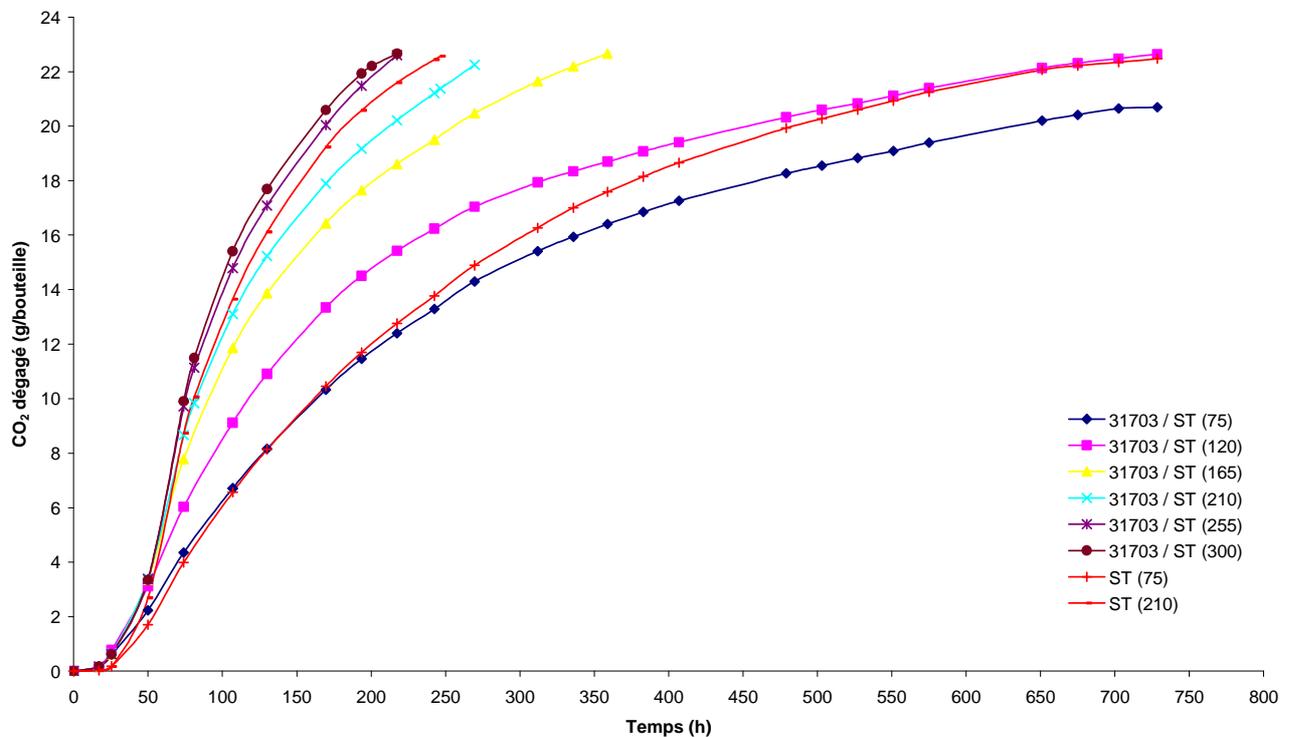
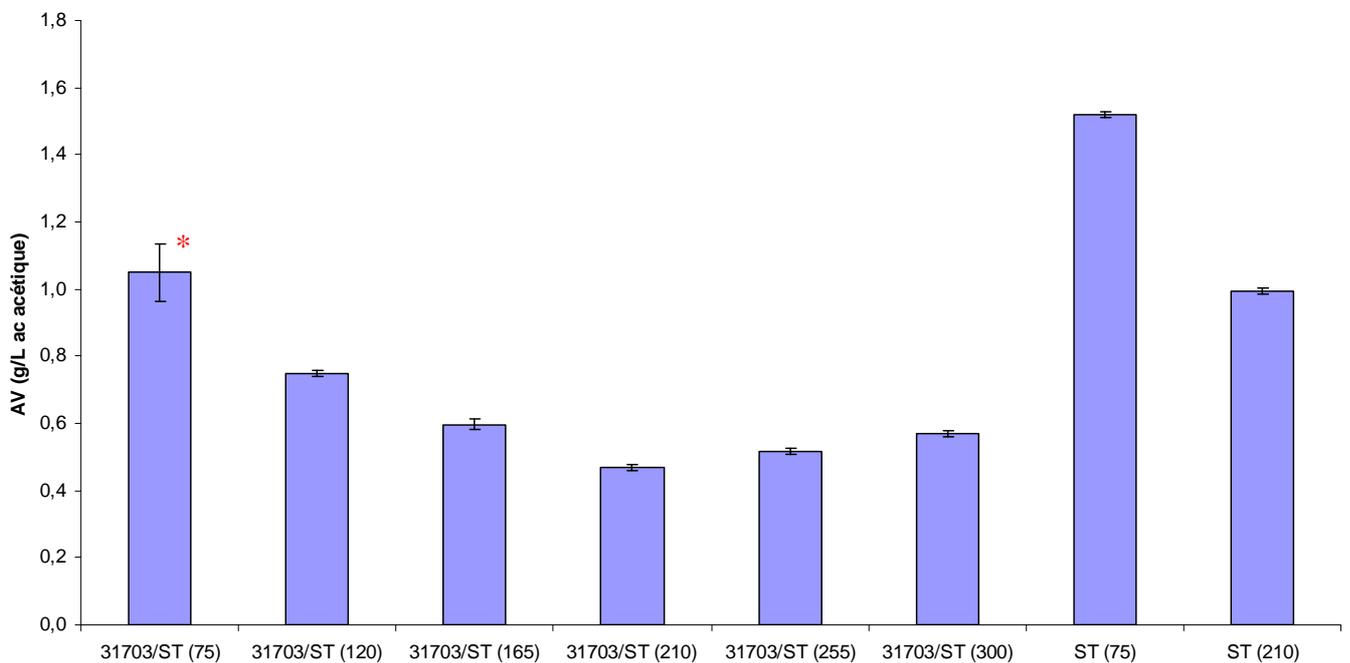


Figure 52 : Evolution du dégagement de CO₂ au cours du temps pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure de *S. cerevisiae* ST. Milieu liquoreux ajusté à différentes concentrations en azote assimilable : 75, 120, 165, 210, 255 ou 300 mgN/L. Moyennes de 2 répétitions. Ecart type max $\pm 0,6$.

La concentration finale en AV pour les différentes modalités est présentée sur la figure 53. La concentration en azote assimilable influence la production d'AV pour les co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* (différences significatives). En effet, l'augmentation de la

concentration en azote assimilable de 75 à 210 mg/L engendre la réduction de la production d'AV finale qui est alors respectivement de 1,05 et 0,47 g/L acide acétique. L'augmentation de la concentration initiale à des doses supérieures à 210 mg/L engendre des productions d'AV finales supérieures à celle de 210 mg/L mais toujours inférieures au milieu le plus pauvre en azote. En d'autres termes, dans nos conditions avec les souches 31703 et ST, la concentration optimale d'azote assimilable initial pour obtenir une production la plus limitée possible d'AV est de 210 mg/L. Cette concentration optimale est proche de celle proposée par Bely *et al.* (2003) lors de fermentation sur moût liquoreux en culture pure de *S. cerevisiae* ST. Les résultats sur la production d'AV par la souche *S. cerevisiae* ST vont également dans ce sens puisque les concentrations en AV finales sont respectivement de 0,99 et 1,52 g/L acide acétique pour les milieux à 210 et 75 mg/L d'azote assimilable initiale.

Par ailleurs, la production d'AV pour la même concentration en azote est significativement plus faible pour les co-inoculations que pour les fermentations pures avec *S. cerevisiae*. Ainsi, pour le milieu à 210 mg/L d'azote assimilable, la co-inoculation 31703 / ST permet une réduction de la production d'AV de 53%.



* Arrêt de fermentation

Figure 53 : Acidité volatile finale pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure *S. cerevisiae* ST. Milieu liquoreux ajusté à différentes concentrations en azote assimilable : 75, 120, 165, 210, 255 ou 300 mgN/L. Moyennes de 2 répétitions.

Les populations de levures ont également été évaluées pour chaque modalité sans différencier les populations (*T. delbrueckii* 31703, *S. cerevisiae* ST et population indigène). Les concentrations cellulaires maximales (X_{max}) selon les modalités sont présentées sur la figure 54. En co-inoculation, l'enrichissement du moût en azote de 75 à 165 mg/L se traduit par une augmentation de X_{max} alors que cette population n'est pas affectée pour des concentrations supérieures. Pour les cultures pures de *S. cerevisiae*, X_{max} est également augmentée lorsque la concentration en azote initiale augmente de 75 à 210 mgN/L mais cependant les populations sont plus faibles que celles obtenues en co-inoculations pour une concentration en azote équivalente. Bely *et al.* (2003) ont obtenu des résultats similaires. En co-inoculation, aucune corrélation significative n'a été observée entre X_{max} et la production d'AV (données non présentées). Ce résultat diffère de celui obtenu par Bely *et al.* (2003) avec des cultures pures de *S. cerevisiae* ST. En effet, les auteurs ont mis en évidence pour cette souche que la production d'AV était liée à la quantité de levure formée. Ne connaissant pas les évolutions des différentes populations en co-inoculations, il est difficile d'exploiter plus amplement ces résultats.

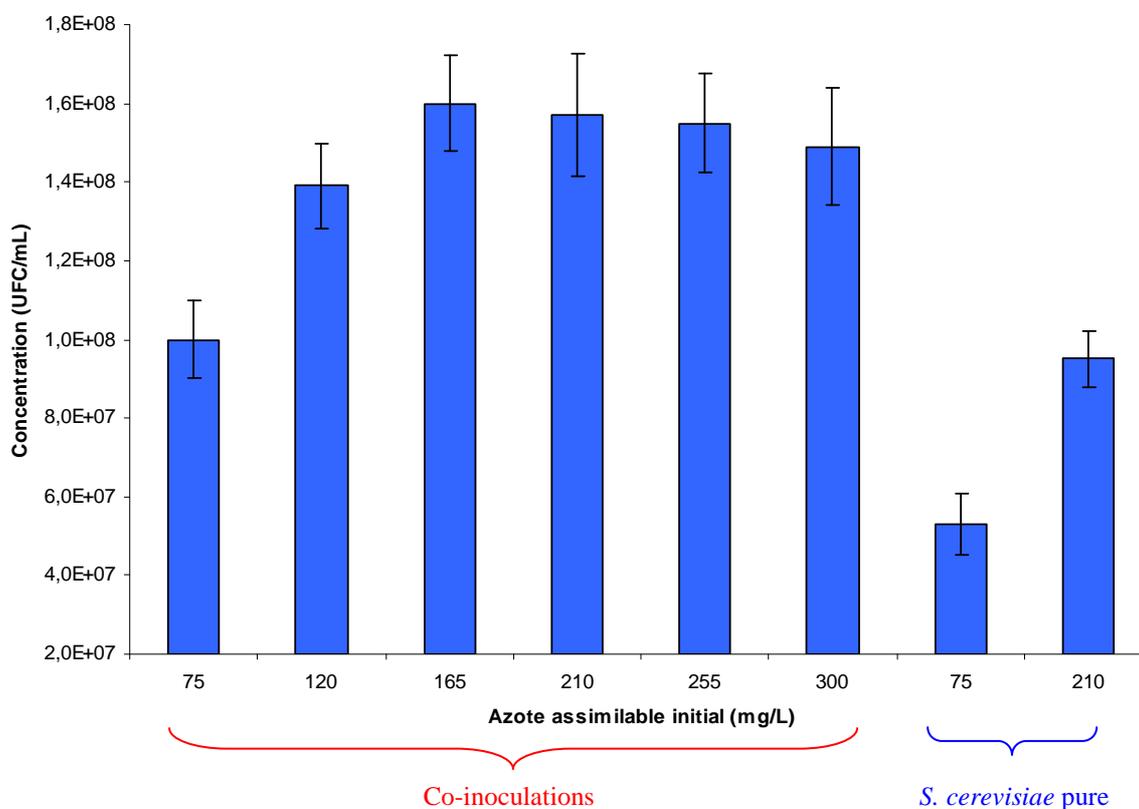
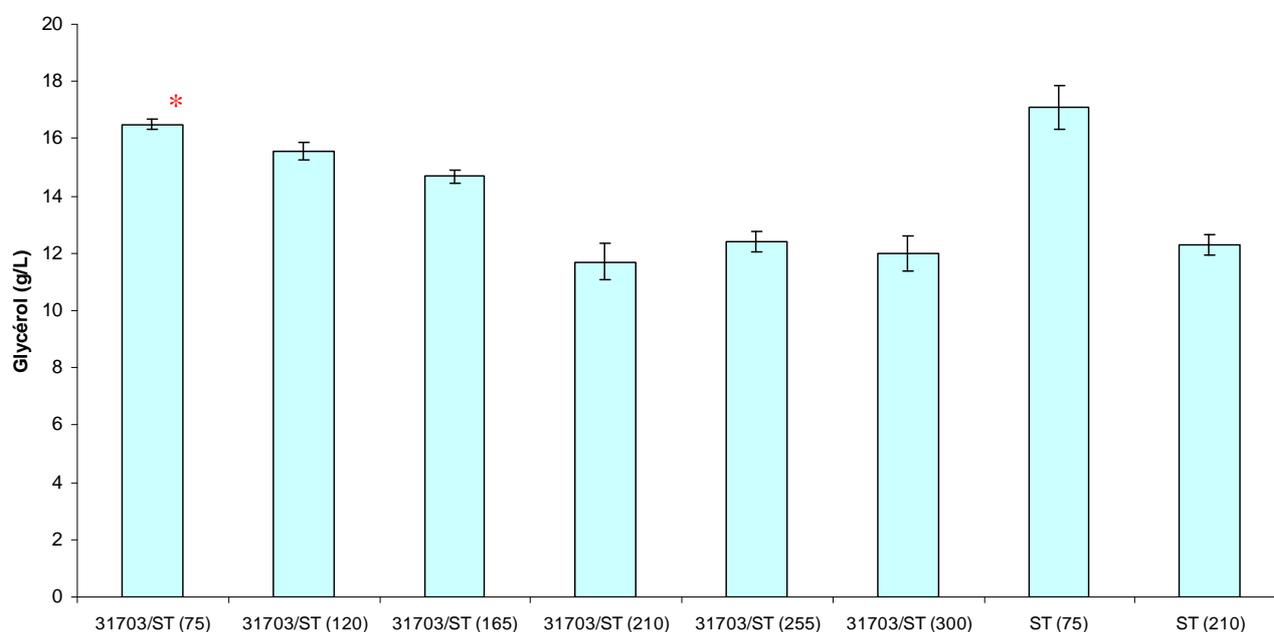


Figure 54 : Concentrations cellulaires maximales (X_{max}) en fonction de la concentration en azote assimilable du moût pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 2 comptages sur milieux gélosés.

La figure 55 présente la concentration en glycérol finale pour chaque modalité. Comme pour l'AV, la concentration initiale en azote assimilable influence significativement la production de glycérol pour les modalités en co-inoculations. En effet, l'augmentation de la concentration initiale en azote jusqu'à 210 mg/L engendre une diminution de la production de glycérol. Des concentrations initiales supérieures en azote n'entraînent cependant pas de surproduction de glycérol, contrairement à l'AV, mais une production similaire à celle retrouvée pour la modalité ajusté à 210 mg/L d'azote assimilable. De plus, pour le milieu à 210 mg/L d'azote assimilable, la production de glycérol de la co-inoculation 31703 / ST est similaire à celle de la modalité *S. cerevisiae* ST pure.



* Arrêt de fermentation

Figure 55 : Concentration en glycérol pour les 6 modalités en co-inoculation 31703 / ST et les 2 modalités en culture pure *S. cerevisiae* ST. Milieu liquoreux ajusté à différentes concentrations en azote assimilable : 75, 120, 165, 210, 255 ou 300 mgN/L. Moyennes de 2 répétitions.

En conclusion sur cette partie, nous pouvons dire que la variation de la concentration en azote assimilable initiale de 75 à 300 mg/L, lors de co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae*, influence la durée de fermentation et la production d'AV et de glycérol. En effet, dans nos conditions, plus la concentration en azote initiale est élevée plus la durée de fermentation est courte. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en azote jusqu'à 210 mg/L permet la diminution de la production d'AV et de glycérol. Des concentrations initiales supérieures

entraînent une augmentation de la production pour l'AV et n'ont pas d'effet supplémentaire pour le glycérol, par rapport à la dose de 210 mg/L.

La concentration en azote assimilable initiale de 210 mg/L semble donc être la dose optimale pour le couple 31703 /ST puisqu'elle permet d'obtenir un vin avec une AV réduite de 53% et une production de glycérol similaire à la modalité témoin *S. cerevisiae* pure pour une durée de fermentation plus longue de seulement quelques heures (+23h). Cette concentration en azote initiale est très proche de celle établie par Bely *et al.* (2003) lors de la fermentation de vins liquoreux par *S. cerevisiae* ST pure (190 mg/L).

1.3 Comparaison des souches 31703, OXT1 1//2 et de 2 souches commerciales

Au cours de l'année 2009, deux souches de l'espèce *T. delbrueckii* ont été mises sur le marché des levures œnologiques par 2 sociétés concurrentes de la société Laffort, on les nommera A et B. Le but de cette expérience, réalisée au laboratoire, est de comparer les performances en co-inoculation avec *S. cerevisiae* ST (cinétique fermentaire et production d'AV) de ces 2 souches commerciales, sélectionnées pour leurs propriétés aromatiques, à notre souche de référence sur moût liquoreux: 31703. La souche *T. delbrueckii* OXT1 1//2, qui s'est révélée très intéressante pour l'élaboration de vins blancs secs lors d'expériences menées parallèlement à celle-ci (Chapitre IV.2, partie Résultats et Discussion), a également été comparée aux 2 souches commerciales. En effet, la société Laffort ne souhaite commercialiser qu'une seule souche de levure *T. delbrueckii* qui doit, en association avec *S. cerevisiae*, produire peu d'AV sur moût liquoreux et avoir des propriétés aromatiques intéressantes sur moûts blancs secs et rosés. Le même raisonnement sera appliqué pour la souche 31703 sur moûts blanc sec et rosé (Chapitre IV.2.1, partie Résultats et Discussion).

Le milieu de fermentation utilisé est un moût congelé de Sémillon botrytisé avec une concentration en sucres de 330 g/L (18,85 % vol. éthanol potentiel) et ajusté à 210 mg/L d'azote assimilable par ajout de thiazote. Sa population initiale en levures s'élève à $5,3 \cdot 10^6$ cellules viables/mL après décongélation. Du fait de cette forte concentration en levures indigènes, qui peut du reste être rencontrée à l'échelle industrielle, nous avons augmenté les quantités de levures dans les inoculum des 2 espèces tout en respectant le rapport 10/1 utilisé lors de nos précédentes expériences, soit 10^7 cellules viables/mL de *T. delbrueckii* pour 10^6 cellules viables/mL de la souche *S. cerevisiae* ST. La modalité avec *S. cerevisiae* ST pure a étéensemencée à 10^6 cellules viables/mL. Toutes les modalités ont étéensemencées à partir de

pré-cultures de 24h à 24°C dans le milieu de fermentation dilué au demi. Toutes les modalités ont été réalisées en triplicata.

La figure 56 présente les cinétiques de fermentation des 5 modalités : ST pure, OXT1 1//2 / ST, A / ST, B / ST et 31703 / ST. Toutes ces modalités ont atteint les 14% vol. éthanol désirés et la présence de *T. delbrueckii* et de la souche *S. cerevisiae* ST a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la fermentation. La durée de fermentation de la *S. cerevisiae* pure est légèrement inférieure à celles des différentes co-inoculations malgré une phase de latence un peu plus longue. Si l'on compare les différentes co-inoculations entre elles, les phases de latence sont similaires mais la cinétique de fermentation de la co-inoculation avec la souche OXT1 1//2 est un peu plus rapide et lui permet d'atteindre les 14% vol désirés avant les co-inoculations réalisées avec notre souche de référence 31703 et avec les 2 souches commerciales A et B. Les durées de fermentation des différentes modalités sont 329, 370, 393, 430 et 430 h pour respectivement ST pure, OXT1 1//2 / ST, 31703 / ST, A / ST et B / ST.

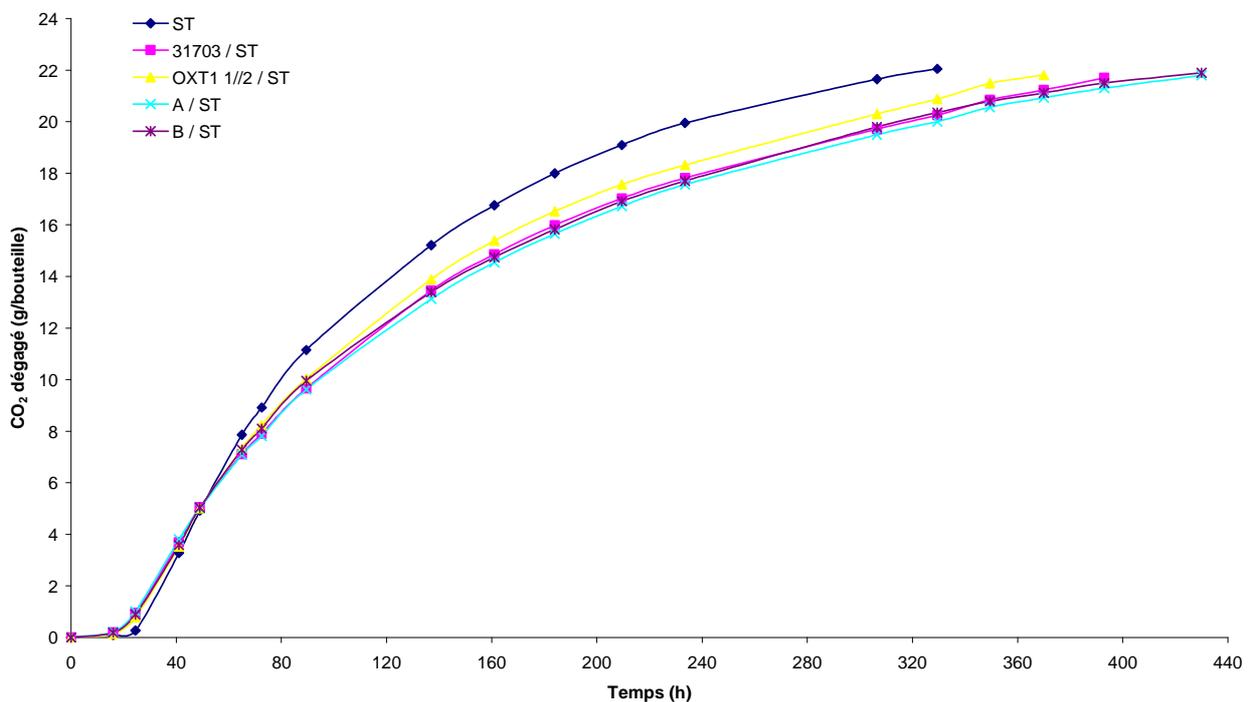


Figure 56 : Evolution du dégagement de CO₂ au cours du temps pour les co-inoculations et la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions. Ecart type max $\pm 0,6$.

La figure 57 présente les concentrations en AV finale des 5 modalités dans les vins au moment du mutage. Les co-inoculations permettent toutes une réduction significative de l'AV de 46, 51, 49 et 50% par rapport à la modalité témoin *S. cerevisiae* pure, pour les souches 31703, OXT1 1//2, A et B. La modalité avec la souche OXT1 1//2 présente la production d'AV volatile la plus faible.

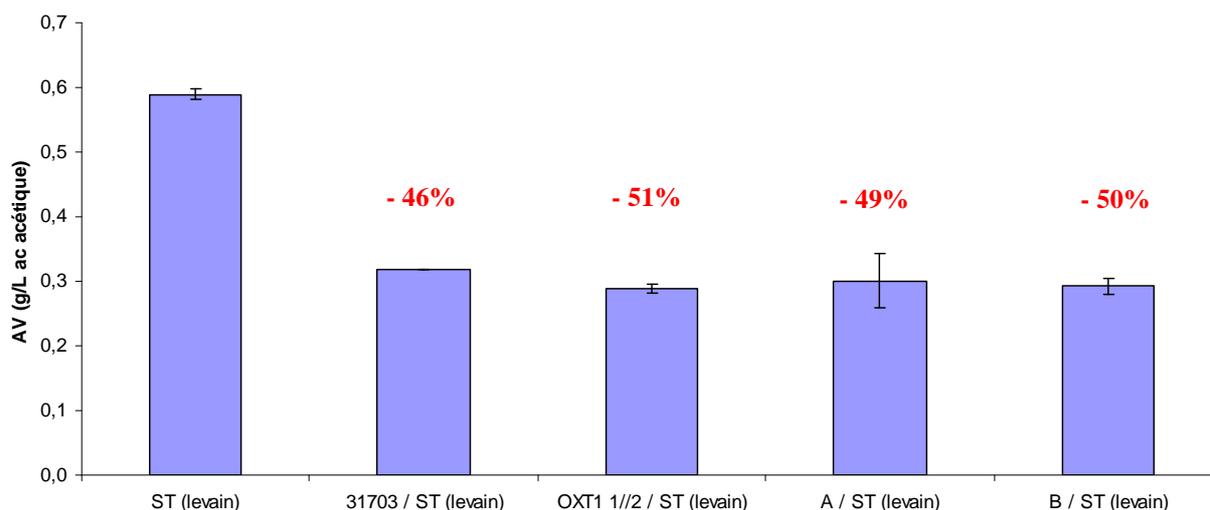


Figure 57: Acidité volatile finale pour les 4 co-inoculations et la culture pure *S. cerevisiae* ST. Moyennes de 3 répétitions.

En conclusion, cette expérience réalisée au laboratoire nous a permis de voir que l'utilisation de la souche OXT1 1//2, sélectionnée originellement pour l'élaboration de vins blancs secs, est également utilisable pour la réalisation de co-inoculations sur moût liquoreux dans le but de réduire l'AV. En effet, malgré une cinétique de fermentation légèrement plus faible que celle obtenue pour la modalité avec *S. cerevisiae* pure, elle permet une réduction de la production d'AV de l'ordre de 51% soit légèrement plus que notre souche de référence 31703 pour une durée de fermentation un peu plus courte. Par ailleurs, les 2 souches commerciales qui ont été sélectionnées pour leurs propriétés aromatiques permettent également une réduction de la production d'AV et pourraient être utilisées, malgré leurs cinétiques de fermentation légèrement plus faibles, pour l'élaboration des vins liquoreux. Ces résultats sont cohérents avec nos premières conclusions sur milieu synthétique mettant en évidence le métabolisme spécifique de cette espèce, à savoir sa faible production d'AV.

1.4 Essais en chai

Deux essais ont été réalisés au cours des vendanges 2009 dans 2 propriétés de l'appellation « Sauternes » : Château La Tour Blanche, premier grand cru classé à Bommes et Château Doisy Daëne, grand cru classé à Barsac. Les fermentations ont été réalisées en duplicata dans des barriques de 220 L remplies avec 200 L de moût de Sémillon botrytisé.

Le but de ces essais est de vérifier que la réduction d'AV obtenue en laboratoire par l'utilisation de co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae*, en comparaison à la modalité *S. cerevisiae* pure, pouvait également être obtenues en conditions réelles de vinifications où les concentrations en levures des moûts sont souvent très élevées et supérieures à nos conditions de laboratoire. Pour réaliser ces expériences, n'ayant pas de production de nos souches sous forme de LSA (levures sèches actives), nous avons produit en réacteur uniquement la souche OXT1 1//2 dans des conditions similaires aux industriels mais sans réaliser l'étape de la déshydratation. Les 2 essais ont été réalisés selon le même protocole que l'essai précédent en respectant un rapport de 10/1 entre la souche de *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la souche de *S. cerevisiae* ST (10^7 cellules viables/mL de *T. delbrueckii* pour 10^6 de la souche *S. cerevisiae* ST). Seuls le mode d'ensemencement et la conduite de la température ont été différents entre les châteaux.

Le premier essai a été réalisé au château La Tour Blanche à partir d'un moût de Sémillon riche en sucres, 360 g/L (soit 20,6 % vol. éthanol potentiel), ajusté à 210 mg/L d'azote assimilable par ajout de thiazote, et dont la température initiale était de 20°C et la population de levures de $3,5 \cdot 10^5$ cellules/mL. La modalité en co-inoculation et la modalité avec *S. cerevisiae* ST pure ont été inoculées par ensemencement direct, c'est-à-dire sous forme de crème de levure pour la souche *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et sous forme de LSA après réhydratation pour la souche *S. cerevisiae* ST.

La présence de *T. delbrueckii* dans la modalité en co-inoculation et de la souche *S. cerevisiae* ST dans les 2 modalités a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la fermentation. Les cinétiques de fermentations obtenues sont présentées sur la figure 58. Comme il a été déjà observé en laboratoire, la durée de phase de latence est légèrement plus courte dans la modalité en co-inoculation mais la fermentation a atteint les 13% vol. éthanol désirés par le château, une journée après la culture pure avec *S. cerevisiae*.

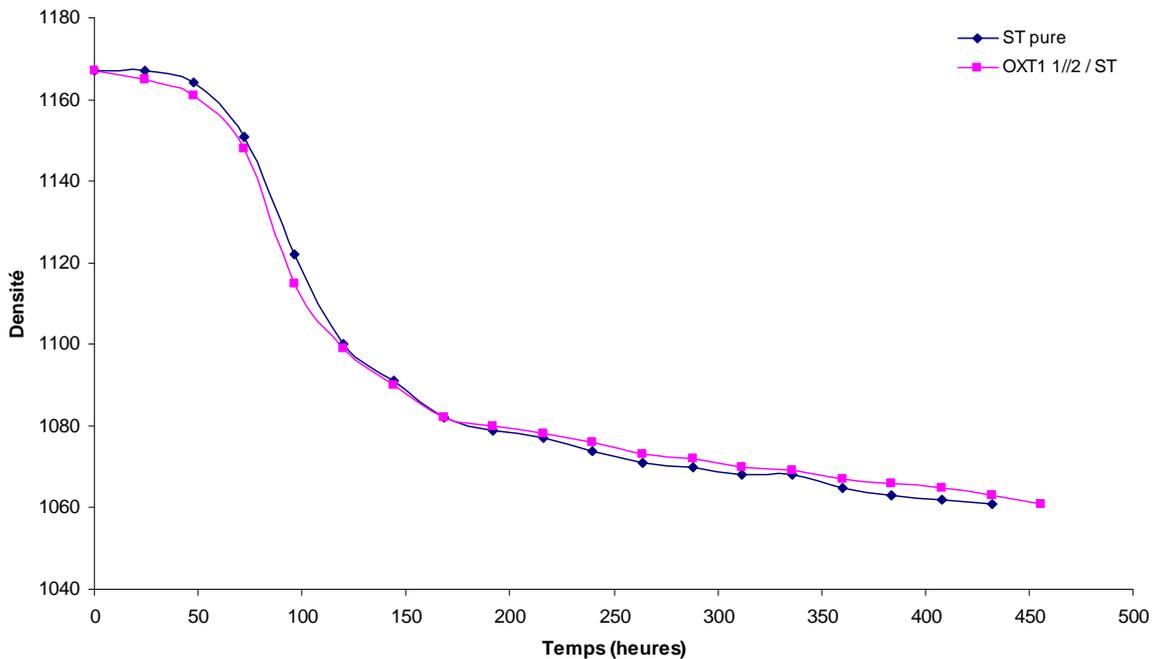


Figure 58 : Evolution de la densité au cours du temps pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Essai Château La Tour Blanche. Moyennes de 2 répétitions. Ecart type max ± 1 .

Les concentrations en AV finale sont présentées sur la figure 59. La co-inoculation avec la souche OXT1 1//2 a permis une réduction de la production d'AV de l'ordre de 24% par rapport à la fermentation réalisée avec *S. cerevisiae* pure. On peut cependant noter que les concentrations en AV sont très élevées. La modalité ST pure a atteint des concentrations supérieures au seuil autorisé par la législation de 1,5 g/L, contrairement à la modalité mixte. Ces fortes concentrations sont notamment dues à la concentration très élevée en sucres du moût, au mode d'ensemencement (direct) et à une gestion de la température insuffisante. En effet, il a été clairement montré que des concentrations en sucres supérieures à 350 g/L ainsi qu'un ensemencement direct sous forme de LSA, c'est-à-dire sans préculture au préalable dans du moût dilué pour adapter la levure aux fortes concentrations en sucres, engendraient des fortes productions d'acidité volatile (Bely *et al.*, 2005). Concernant la gestion de la température, les températures dans les barriques en début de fermentation ont atteint des valeurs proches de 27°C sur une durée de 3 jours. Ces fortes températures pendant la croissance pourraient également participer à l'élévation des quantités d'AV dans le vin.

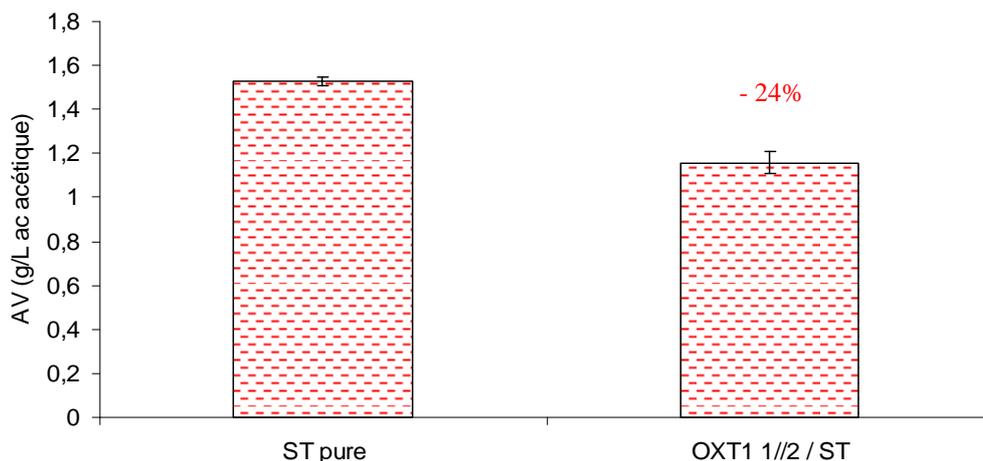


Figure 59 : Acidité volatile finale pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Essai Château La Tour Blanche. Moyennes de 2 répétitions.

Avant mutage, la quantité de SO_2 à additionner pour stopper la fermentation alcoolique a été calculée pour cette expérience. Quelle que soit la modalité, co-inoculation ou culture pure, la quantité à ajouter pour obtenir 50 mg/L de SO_2 libre était de 19 g/hL. Le pouvoir de combinaison du vin était donc assez faible et similaire pour les 2 modalités.

En fin de fermentation alcoolique, un test triangulaire a été réalisé par un premier panel de 20 personnes, pour voir si le vin issu de la co-inoculation est différent du vin réalisé avec *S. cerevisiae* pure. Les résultats de cette dégustation nous permettent de dire que ces 2 vins sont significativement différents. Une analyse sensorielle descriptive a alors été réalisée avec un autre panel de 20 dégustateurs. Il en ressort qu'au niveau olfactif le vin issu de la co-inoculation est perçu comme étant plus intense, avec des notes de fruits frais et fruits confits mais également des notes boisées plus prononcées. Il est également distingué comme étant plus complexe que la modalité avec *S. cerevisiae* pure, caractérisé par des descripteurs type agrumes et floraux. Au niveau gustatif, on peut percevoir une différence notable au niveau du volume en bouche où la co-inoculation est caractérisée par un gras en bouche plus prononcé. Au final, le vin issu de levurage mixte est apprécié pour sa complexité encore renforcée par des assemblages avec des lots classiques *S. cerevisiae* pure.

Le second essai a été réalisé au château Doisy Daëne sur un moût liquoreux de Sémillon botrytisé de 370 g/L de sucres (21,1 % vol. potentiel) ajusté à 210 mg/L d'azote assimilable par ajout de thiazote et dont la température initiale était de 16°C et la population de levures de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/mL. La modalité en co-inoculation et la modalité avec *S.*

cerevisiae ST pure ont été inoculées après pré-culture de 24h dans le même moût dilué au demi, contrairement à l'essai précédent (inoculation directe). La pré-culture a été préparée à partir de la crème de levure pour la souche *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et de LSA pour la souche *S. cerevisiae* ST. Une attention particulière a été portée à la température du moût qui n'a pas dépassé 24°C au cours de la fermentation alcoolique.

La présence de *T. delbrueckii* dans la modalité en co-inoculation et de la souche *S. cerevisiae* ST dans les 2 modalités a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la fermentation. Comme pour l'essai précédent, les cinétiques de fermentation entre la modalité OXT1 1//2 / ST et la modalité *S. cerevisiae* ST pure sont relativement proches bien que cette dernière ait atteint les 14% vol. éthanol désirés en 19 jours soit un de moins que la modalité en co-inoculation. L'inoculation sous forme de pré-cultures, avec une température de fermentation bien maîtrisée a permis une production d'AV similaire à l'essai précédent (Château La Tour Blanche) malgré une teneur en sucres du moût plus élevée de 10 g/L. En effet, la concentration en AV finale de la modalité en co-inoculation est de 1,07 g/L exprimée en acide acétique contre 1,62 g/L pour la modalité *S. cerevisiae* ST pure (figure 60). L'utilisation de co-inoculation *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* a permis dans ces conditions difficiles une réduction d'AV de 34% par rapport à la modalité *S. cerevisiae* pure et surtout de ne pas dépasser la limite légale autorisée de 1,5 g/L d'acide acétique. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été obtenue lors de l'estimation de la quantité de SO₂ à ajouter pour réaliser le mutage (19 g/hL).

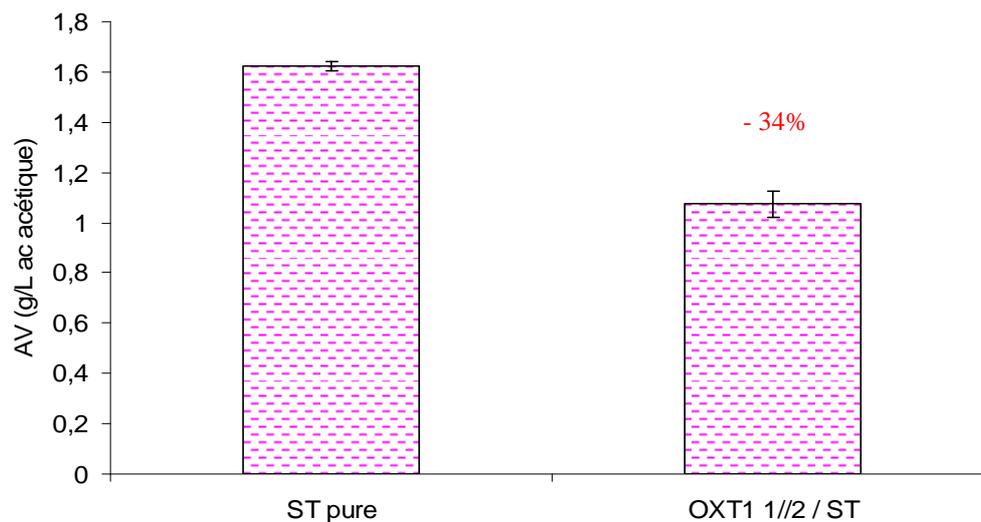


Figure 60 : Acidité volatile finale pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* ST. Essai Château Doisy Daëne. Moyennes de 2 répétitions.

Des tests triangulaires (20 personnes) ont permis, comme pour le premier essai, de mettre en évidence une différence significative entre les 2 types de vin lors de la dégustation. L'analyse sensorielle descriptive réalisée avec un panel de 20 dégustateurs expérimentés a donné des résultats similaires au premier essai à savoir un nez plus fruité et un volume en bouche plus important pour la modalité en co-inoculation que pour la modalité avec *S. cerevisiae* pure caractérisée par un nez plus frais avec des notes d'agrumes prononcées et une acidité en bouche plus prononcée.

En conclusion, la co-inoculation *T. delbrueckii* OXT1 1//2 / *S. cerevisiae* ST a permis dans ces 2 expériences non seulement de réduire la production d'AV de 24 et 34% par rapport à la modalité *S. cerevisiae* pure correspondante mais également de ne pas dépasser la limite légale autorisée de 1,5 g/L d'acide acétique (contrairement à la modalité pure). Les fermentations ont atteint les 13-14% vol. éthanol désirés dans des durées proches des fermentations réalisées par *S. cerevisiae* pure et les doses de SO₂ ajoutées pour le mutage ont été identiques au témoin. Pour finir, les vins obtenus par co-inoculation sont perçus comme significativement différents des vins fermentés par *S. cerevisiae* pure. La co-inoculation OXT1 1//2 / ST donne des vins caractérisés par un nez plus fruité et un volume en bouche plus important que pour la modalité avec *S. cerevisiae* pure caractérisée par un nez plus frais et une acidité en bouche plus prononcée. Les vins issus de cette co-inoculation ne sont pas atypiques et permettent après assemblage avec des lots issus de fermentations pures *S. cerevisiae* d'obtenir des vins plus complexes avec une acidité volatile réduite.

Si l'on compare tous nos essais réalisés en co-inoculation sur moût liquoreux, en laboratoire ou en chai, on peut constater que, quelle que soit la souche de *T. delbrueckii* utilisée en co-inoculation avec la souche *S. cerevisiae* ST, il y a toujours réduction de la production d'AV, de 23 à 59% selon les essais par rapport à la modalité *S. cerevisiae* pure. Cette réduction est cependant plus ou moins importante selon la souche de *T. delbrueckii* utilisée. La variabilité intraspécifique de cette espèce pour la production d'AV, mise en évidence lors de nos travaux en culture pure sur milieux synthétiques, se retrouve lors des co-inoculations avec *S. cerevisiae*. Il en est de même pour les cinétiques de fermentations qui ont cependant toujours permis d'atteindre les 13-14% vol. éthanol désirés. Le rapport d'inoculation n'a pas d'effet sur la production d'AV mais joue un rôle important sur la durée de fermentation qui est plus courte lorsque la concentration initiale en *S. cerevisiae* est plus élevée. Le rapport d'inoculation avec 10 fois plus de *T. delbrueckii* que de *S. cerevisiae* (10/1) s'est montré particulièrement efficace car il permet une réduction de l'AV importante avec des durées de

fermentation proches de la modalité *S. cerevisiae* pure. Par ailleurs, la variation de la concentration initiale en azote assimilable lors des co-inoculations influence la durée de fermentation et la production d'AV. Dans nos conditions, avec le couple *T. delbrueckii* 31703 / *S. cerevisiae* ST, une concentration initiale de 210 mgN/L apparaît comme la dose idéale pour réduire au maximum la production d'AV avec des durées de fermentation courtes. Pour finir, nos 2 essais réalisés en chai avec la souche OXT1 1//2, initialement remarquée pour ses aptitudes à l'élaboration des vins blancs secs, ont permis de réduire la concentration en AV et ainsi d'obtenir des vins avec une concentration inférieure à la teneur réglementaire, ce qui n'est pas le cas des vins réalisés dans les mêmes conditions avec *S. cerevisiae* pure. Les vins obtenus ont alors un pouvoir de combinaison du SO₂ similaire à la modalité pure mais sont perçus à la dégustation comme significativement différents, notamment grâce à un nez plus fruité et un volume en bouche plus important que pour la modalité *S. cerevisiae* pure. Au final, l'assemblage des vins issus de co-inoculation avec des lots issus de fermentations pures *S. cerevisiae* permet d'obtenir des vins plus complexes avec une acidité volatile réduite.

2 Moûts blancs secs et rosés

Pour réaliser les expériences de co-inoculation sur blancs secs et rosés, nous nous sommes appuyés sur nos travaux réalisés sur moûts liquoreux. L'objectif de ces expériences est de vérifier si la réalisation de co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* permet de moduler la composition aromatique des vins secs.

2.1 Essai en laboratoire

Le but de cet essai, réalisé au laboratoire, est d'évaluer les caractéristiques fermentaires et aromatiques de 4 souches de *T. delbrueckii* en co-inoculation avec la souche *S. cerevisiae* F33. Deux souches de *T. delbrueckii* ont été sélectionnées pour cet essai pour la faible durée de leurs phases de latence et leurs bonnes cinétiques fermentaires lors de fermentations « pures » sur milieux synthétiques : OXT1 1//2 et Lm2T7. Les 2 autres souches utilisées sont celles sélectionnées pour leurs bonnes performances en co-inoculation sur moûts liquoreux afin de vérifier si elles le sont aussi lors de la fermentation d'un vin blanc sec. La souche commerciale *S. cerevisiae* F33 a été choisie comme témoin, pour sa forte production d'esters. Le milieu utilisé est un moût de sémillon frais ayant une teneur en sucres de 212 g/L (environ 12% vol. éthanol potentiels) ajusté à 200 mg/L d'azote assimilable par ajout de thiazote. Sa

turbidité est voisine de 200 NTU. La population initiale de levures dans le moût est de $2,6 \cdot 10^4$ cellules/mL.

La fermentation a été réalisée à 18°C. Les 4 souches de *T. delbrueckii* ont été utilisées en co-inoculation avec la souche *S. cerevisiae* F33 avec un rapport 10/1, c'est-à-dire 10^7 cellules viables/mL pour les *T. delbrueckii* et 10^6 cellules viables/mL pour F33. Les fermentations ont été réalisées en duplicata. La présence de la souche *S. cerevisiae* F33 et des 3 souches de *T. delbrueckii* : OXT1 1//2, Lm2T7 et Cbm621 a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la fermentation, contrairement à la souche 31703. Cette souche, bien que présentant des propriétés très intéressantes sur les milieux à hautes teneurs en sucres, ne semble pas adaptée aux milieux à plus faibles concentrations. En effet, sur milieu synthétique MS (240 g/L de sucres) elle est caractérisée par des phases de latences assez longues et une population maximale peu élevée. Cette modalité ne sera donc pas prise en compte dans la discussion.

Les cinétiques de fermentation des 3 co-inoculations ainsi que celle de la modalité témoin *S. cerevisiae* F33 pure sont représentées sur la figure 61. Les co-inoculations avec les souches OXT1 1//2 et Lm2T7 présentent une durée de phase de latence plus courte que la *S. cerevisiae* pure et achèvent la fermentation alcoolique en même temps que cette dernière. La co-inoculation réalisée avec la souche Cbm621 est plus lente et conduit à un arrêt de fermentation avec la présence de 5 g/L de sucres résiduels.

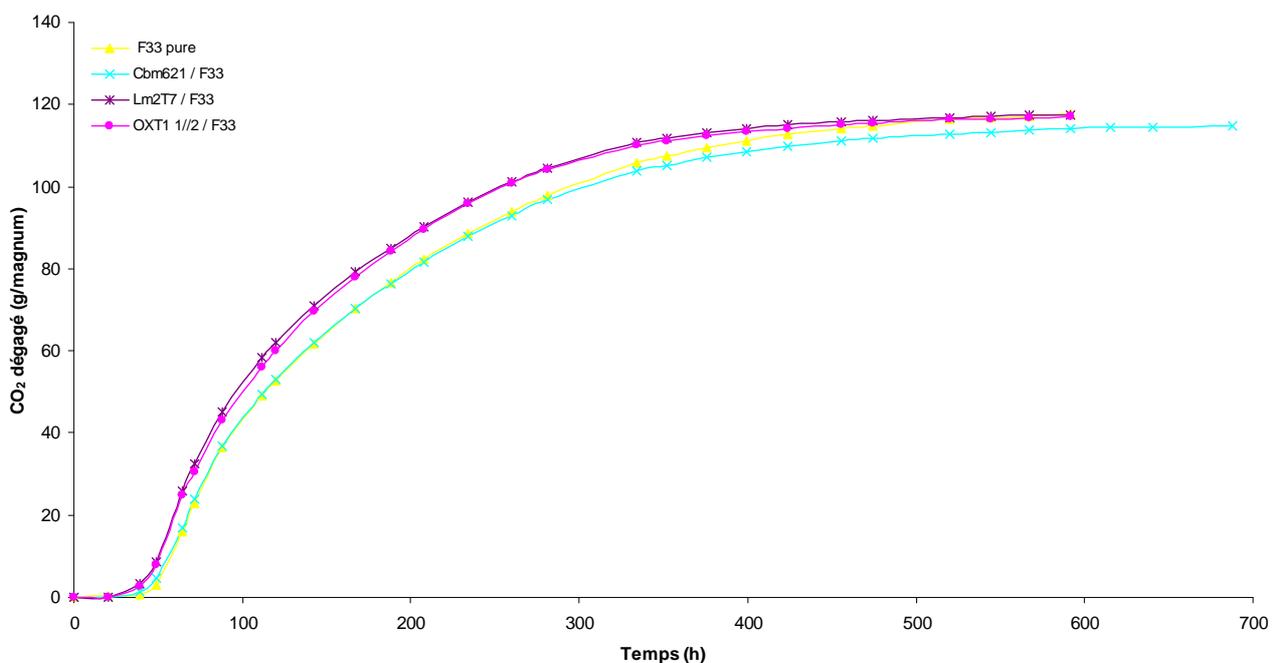


Figure 61 : Evolution du dégagement de CO₂ au cours du temps pour les 3 co-inoculations et la culture pure *S. cerevisiae* F33. Moyennes de 2 répétitions. Ecart type max $\pm 2,5$.

Les concentrations en éthanol, sucres résiduels, azote assimilable et AV pour les différentes modalités sont résumées dans le tableau 17. On peut noter que l'association de la souche Lm2T7 / F33 a permis la plus faible production d'acidité volatile.

Tableau 17 : Concentrations en éthanol, sucres, azote résiduel et acidité volatile en fin de fermentation alcoolique sur moût Sémillon, pour les 3 co-inoculations et la culture pure *S. cerevisiae* F33. Moyennes de 2 répétitions.

	Ethanol (%vol)		Sucres (g/L)		Azote assimilable (mg/L)		AV (g/L acide acétique)	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
LM2T7 / F33	11,79	0,06	1,45	0,12	33,5	0,71	0,18	0,01
OXT1 1//2 / F33	11,9	0,01	1,35	0,15	34,5	0,81	0,23	0,01
Cbm621 / F33	11,44	0,01	5,1	1,2	31	1,41	0,29	0
F33 pure	11,81	0,1	1,45	0,12	31,5	0,71	0,31	0,02

La production de phényl-2-éthanol ainsi que les 7 principaux esters fermentaires (acétate de phényléthanol, d'isoamyle et d'hexyle, et butyrate, hexanoate, octanoate et décanoate d'éthyle) a été évaluée et présentée pour chaque modalité dans le tableau 18. Les concentrations obtenues pour chaque composé sont toutes supérieures à leur seuil de perception respectif. Ces seuils ont cependant, pour la plupart, étaient établis dans des solutions modèles et peuvent varier en fonction du type de vin étudié.

La production totale d'esters pour les co-inoculations est supérieure à celle de la modalité F33 pure soit 37,3, 33,7, 31,2 et 30,4 pour respectivement Lm2T7 / F33, OXT1 1//2 / F33, Cbm621 / F33 et F33 pure. Malgré une production supérieure de 23% et 11% pour les co-inoculations réalisées avec les souches Lm2T7 et OXT1 1//2, la production totale d'esters n'est pas significativement différente de la modalité témoin en raison du faible nombre de valeurs (duplicata). Les 2 modalités en co-inoculation qui ont produit le plus d'esters sont caractérisées par une production supérieure d'acétate d'isoamyle : + 53 et + 36% et d'acétate de phényléthanol : + 83 et + 61% par rapport à la modalité F33 pure pour respectivement Lm2T7 / F33 et OXT1 1//2 / F33. Leur production de phényl-2-éthanol est également supérieure à la modalité témoin soit + 32% pour les 2 co-inoculations.

Tableau 18 : Production d'arômes fermentaires sur moût Sémillon pour les 3 co-inoculations et la culture pure *S. cerevisiae* F33. Moyennes de 2 répétitions.

Molécules	Descripteurs	Seuil perception (mg/L)	F33 pure		Lm2T7 / F33		OXT1 1/2 / F33		Cbm621 / F33	
			Moyenne (mg/L)	Ecart type (mg/L)						
Phényl-2-éthanol	rose	14 ^(a)	60,35	2,94	79,50	1,08	79,95	0,92	59,75	0,07
Acétate phényl-ethanol	rose	0,25 ^(b)	0,90	0,28	1,65	0,07	1,45	0,07	1,00	0,00
Acétate d'isoamyle	banane	0,03 ^(a)	11,60	1,98	17,60	0,28	15,60	0,14	11,80	0,42
Acétate hexyle	poire	0,67 ^(c)	9,75	1,20	10,00	0,28	9,05	0,07	9,65	0,49
Butyrate d'éthyle	kiwi, fraise mure	0,02 ^(a)	1,30	0,28	1,30	0,00	1,35	0,07	1,30	0,00
Hexanoate d'éthyle	pomme verte	0,014 ^(a)	2,55	0,35	2,50	0,14	2,25	0,07	2,50	0,14
Octanoate d'éthyle	floral, savon	0,58 ^(d)	2,10	0,14	2,05	0,07	1,90	0,14	2,15	0,07
Décanoate d'éthyle	floral, savon	0,2 ^(a)	2,25	0,21	2,20	0,00	2,10	0,00	2,75	0,35
Somme esters			30,45	1,47	37,30	0,28	33,70	0,10	31,15	0,78

a: Ferreira *et al.* (2000), dans solution modèle proche du vin

b: Escudero *et al.* (2007), dans solution modèle proche du vin

c: Pineau (2007), dans vin désaromatisé

d: Etievant (1991), dans vin

En conclusion, cette expérience nous a permis de mettre en évidence que deux souches de *T. delbrueckii* : Lm2T7 et OXT1 1//2 permettent en association avec *S. cerevisiae* F33 sous forme de co-inoculation, d'augmenter la production totale d'esters avec notamment une augmentation importante de la concentration en acétate d'isoamyle et en acétate de phényléthanol mais aussi une augmentation de la production de phényl-2-éthanol en comparaison à la modalité *S. cerevisiae* F33 pure. Les durées de fermentation sont de plus similaires. Par contre, les souches sélectionnées au départ pour leurs performances sur milieux à fortes concentrations en sucres n'ont pas donné satisfaction en co-inoculation car la souche 31703 ne s'est pas implantée et la co-inoculation avec la souche Cbm621 a conduit à la présence de sucres résiduels.

2.2 Essais en chai

Deux essais ont été réalisés au cours des vendanges 2009 au Château Goudichaud située dans l'appellation « Graves de Vayres ». Les fermentations ont été réalisées en duplicata dans des cuves inox de 220 L remplies avec 200 L de moût.

Le but de ces essais est de vérifier que l'augmentation de la complexité aromatique obtenue en laboratoire par l'utilisation de co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* peut fonctionner en conditions réelles de vinification. Nous avons pour cela utilisé, pour ces 2 essais en co-inoculation, un seul couple de levures : *T. delbrueckii* OXT1 1//2 associée à la souche *S. cerevisiae* X5. La souche OXT1 1//2 a été choisie pour ces bonnes performances cinétiques et aromatiques présentées au paragraphe précédent mais aussi pour ses performances aromatiques obtenues au cours d'un autre essai sur un moût de raisin Sauvignon blanc qui a été mené au laboratoire SARCO (non présenté dans ce manuscrit). En effet, au cours de cet essai la production d'esters et de thiols volatils par le couple OXT1 1//2 / X5 s'est révélée beaucoup plus intéressante que celle obtenue avec le couple Lm2T7 / X5. La souche *S. cerevisiae* X5 est une souche commerciale (Laffort, France) couramment utilisée pour la vinification des vins blancs secs et en particulier des Sauvignons blancs pour sa forte capacité à révéler les arômes variétaux de type de thiols volatils.

Les co-inoculations *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* pour les deux essais en chai ont été réalisées avec un rapport 10/1, c'est-à-dire: 10^7 cellules viables/mL pour la souche OXT1 1//2 et 10^6 cellules viables/mL pour la souche X5. La souche OXT1 1//2 a été produite au laboratoire sous forme de crème de levures. Les 2 essais qui suivent ont ainsi été réalisés selon le même protocole.

Le premier essai a été réalisé sur un moût de Sauvignon blanc contenant 213 g/L de sucres (12,9 % vol potentiel) et ajusté à 200 mg/L d'azote assimilable. La présence des souches *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et *S. cerevisiae* X5 a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la fermentation. L'évolution de la densité au cours du temps pour les 2 modalités est présentée sur la figure 62. Les cinétiques de fermentations de ces 2 modalités sont très proches bien que la modalité *S. cerevisiae* pure achève la fermentation alcoolique avec un jour d'avance. Les concentrations d'éthanol, de sucres et d'azote assimilable résiduel à la fin de la fermentation alcoolique sont similaires pour les 2 modalités, mais la production d'AV est plus faible pour la modalité en co-inoculation (tableau 19).

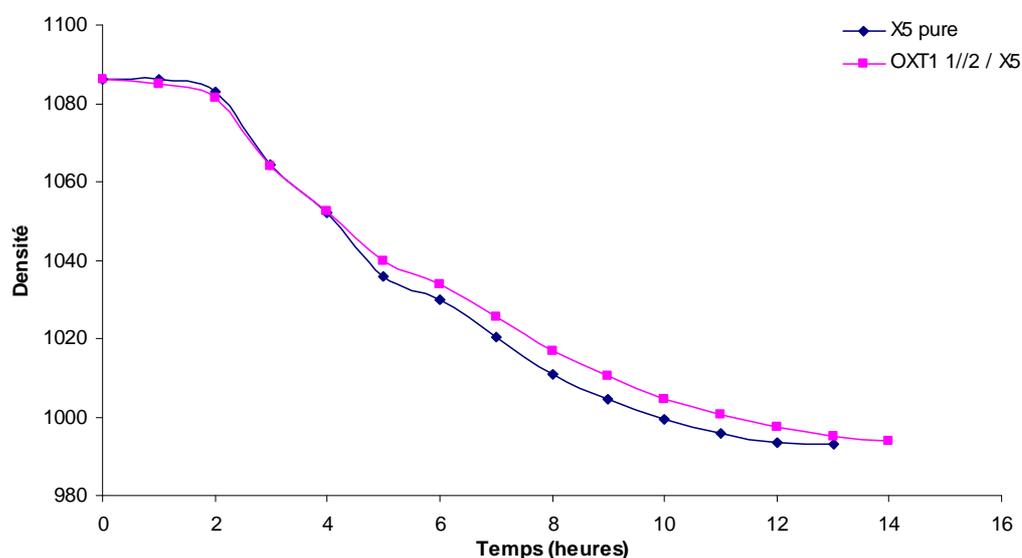


Figure 62 : Evolution de la densité au cours du temps sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* X5. Moyennes de 2 répétitions. Ecart type max ± 1 .

Tableau 19 : Concentrations en éthanol, sucres, azote résiduel et acidité volatile en fin de fermentation alcoolique sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* X5. Moyennes de 2 répétitions.

	X5		X5 / 1//2	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
Ethanol (%vol)	12,85	0,2	12,79	0,1
Sucres (g/L)	0,9	0,1	0,8	0,1
AV (g/L acide acétique)	0,28	0,02	0,20	0,01
Azote assimilable (mg/L)	18	1,4	19	2,1

Les productions de phényl-2-éthanol, des 7 principaux esters fermentaires : acétate de phényléthanol, d'isoamyle et d'hexyle, et butyrate, hexanoate, octanoate et décanoate d'éthyle et de 3 thiols volatils 4MSP, 3SH et A3SH (pour respectivement 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one, 3-sulfanylhexan-1-ol et acétate de 3-sulfanylhexyl), ont été évaluées.

La production d'arômes fermentaires (phényl-2-éthanol plus les 7 esters) est présentée pour les 2 modalités dans le tableau 20. D'après ce tableau, nous pouvons voir que tous ces composés ont été produits à des concentrations supérieures à leur seuil de perception. La modalité en co-inoculation permet, par ailleurs, une production totale d'esters et de phényl-2-éthanol plus importante que la modalité X5 pure, soit une augmentation respective de 25 et 51 %. Par ailleurs, la production de chaque ester a été augmentée de 50, 41, 20, 17, 29, 36 et 4% pour respectivement les molécules suivantes : acétate de phényléthanol, acétate d'isoamyle, acétate d'hexyle, butyrate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, octanoate d'éthyle et décanoate d'éthyle. L'augmentation importante de la concentration totale en esters, avec notamment des productions importantes d'acétate de phényléthanol et d'acétate d'isoamyle ainsi qu'une augmentation de la concentration en phényl-2-éthanol, a déjà été constatée dans l'essai précédent sur moût semillon.

Tableau 20 : Production d'arômes fermentaires sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1/2 et la culture pure de *S. cerevisiae* X5. Moyennes de 2 répétitions.

Molécules	Descripteurs	Seuil perception (mg/L)	X5 pure		OXT1 1/2 / X5	
			Moyenne (mg/L)	Ecart type (mg/L)	Moyenne (mg/L)	Ecart type (mg/L)
Phényl-2-éthanol	rose	14 ^(a)	26,80	1,20	40,60	1,60
Acétate phényl-ethanol	rose	0,25 ^(b)	0,40	0,02	0,60	0,02
Acétate d'isoamyle	banane	0,03 ^(a)	3,40	0,30	4,80	0,20
Acétate hexyle	poire	0,67 ^(c)	4,60	0,20	5,50	0,30
Butyrate d'éthyle	kiwi, fraise mure	0,02 ^(a)	0,60	0,03	0,70	0,04
Hexanoate d'éthyle	pomme verte	0,014 ^(a)	0,70	0,01	0,90	0,03
Octanoate d'éthyle	floral, savon	0,58 ^(d)	1,10	0,03	1,50	0,02
Décanoate d'éthyle	floral, savon	0,2 ^(a)	2,40	0,12	2,50	0,22
Somme esters			13,20	1,20	16,50	1,40

- a: Ferreira *et al.* (2000), dans solution modèle proche du vin
b: Escudero *et al.* (2007), dans solution modèle proche du vin
c: Pineau (2007), dans vin désaromatisé
d: Etievant (1991), dans vin

Les concentrations finales en thiols volatils sont présentées dans le tableau 21. Les concentrations obtenues pour ces 3 composés sont très supérieures à leur seuil de perception en solution modèle comme indiqué dans le tableau. La production totale de thiols volatils a été augmentée de 31% pour la co-inoculation OXT1 1//2 / X5 en comparaison avec la modalité X5 pure. En effet, bien que la concentration en 4MSP soit similaire, les concentrations en 3MH et A3MH ont été augmentées respectivement de 30 et 48%.

De plus, un test triangulaire réalisé avec un panel de 21 personnes a permis de mettre en évidence une différence significative entre ces 2 vins au cours de leur dégustation.

Tableau 21 : Production en thiols volatils sur moût Sauvignon blanc, pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* X5. Moyennes de 2 répétitions.

Molécules	Descripteurs	Seuil perception (ng/L)	X5 pure		OXT1 1//2 / X5	
			Moyenne (ng/L)	Ecart type (ng/L)	Moyenne (ng/L)	Ecart type (ng/L)
4MSP ⁽¹⁾	buis, genêt	0,8 ^(a)	19,90	1,00	19,80	0,80
3SH ⁽²⁾	buis, pamplemousse, passion	60 ^(b)	518,00	12,00	675,00	18,00
A3SH ⁽³⁾	buis, pamplemousse	4,2 ^(c)	63,00	3,00	93,00	4,00
Somme thiols volatils			600,90	15,00	787,80	22,80

(1) 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one, (2) 3-sulfanylhexan-1-ol, (3) acétate de 3-sulfanylhexyl

a: Darriet *et al.* (1995) dans solution modèle proche du vin

b: Tominaga *et al.* (1998) dans solution modèle proche du vin

c: Tominaga *et al.* (1996) dans solution modèle proche du vin

Le deuxième essai a été réalisé sur un moût rosé issu du cépage Merlot dont la concentration en sucres initiale était 214 g/L (12,9 % vol. éthanol potentiel) et dont la concentration en azote assimilable a été ajustée à 200 mg/L par ajout de thiazote. La présence de la souche *T. delbrueckii* OXT1 1//2 dans la modalité en co-inoculation et de la souche *S. cerevisiae* X5 dans les 2 modalités a été confirmée par PCR jusqu'à la fin de la fermentation alcoolique. Malgré des cinétiques fermentaires proches, la modalité *S. cerevisiae* X5 pure a achevé la fermentation un jour avant la modalité en co-inoculation (données non présentées). Les concentrations finales en éthanol, sucres, azote assimilable résiduel et AV sont similaires pour les 2 modalités (tableau 22).

Tableau 22 : Concentrations en éthanol, sucres, azote résiduel et acidité volatile en fin de fermentation alcoolique sur moût rosé de Merlot, pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* X5. Moyennes de 2 répétitions.

	X5		X5 / 1//2	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
Ethanol (%vol)	12,85	0,11	12,36	0,21
Sucres (g/L)	0,50	0,05	1,50	0,06
AV (g/L acide acétique)	0,23	0,02	0,22	0,02
Azote assimilable (mg/L)	18	1	19	2

Les productions de phényl-2-éthanol et des 7 principaux esters fermentaires (mêmes composés que pour l'essai sur Sauvignon blanc) ont été évaluées et sont présentées dans le tableau 23. La modalité OXT1 1//2 / X5 permet une augmentation de la production de phényl-2-éthanol de 36% mais présente une production totale d'esters similaire à la modalité *S. cerevisiae* X5 pure. Si l'on regarde la production pour chaque ester, la modalité en co-inoculation a produit 2 fois plus de butyrate d'éthyle mais moins d'acétate de phényléthanol et de décanoate d'éthyle.

Tableau 23 : Production d'arômes fermentaires sur moût rosé de Merlot, pour la co-inoculation avec *T. delbrueckii* OXT1 1//2 et la culture pure de *S. cerevisiae* X5. Moyennes de 2 répétitions.

Molécules	Descripteurs	Seuil perception (mg/L)	X5 pure		OXT1 1//2 / X5	
			Moyenne (mg/L)	Ecart type (mg/L)	Moyenne (mg/L)	Ecart type (mg/L)
Phényl-2-éthanol	rose	14 ^(a)	40,30	3,20	54,90	3,40
Acétate phényl-ethanol	rose	0,25 ^(b)	1,00	0,08	0,90	0,10
Acétate d'isoamyle	banane	0,03 ^(a)	5,40	0,05	5,60	0,04
Acétate hexyle	poire	0,67 ^(c)	0,10	0,02	0,10	0,03
Butyrate d'éthyle	kiwi, fraise mure	0,02 ^(a)	0,10	0,01	0,20	0,01
Hexanoate d'éthyle	pomme verte	0,014 ^(a)	0,00	0,00	0,00	0,00
Octanoate d'éthyle	floral, savon	0,58 ^(d)	1,60	0,15	1,60	0,10
Décanoate d'éthyle	floral, savon	0,2 ^(a)	1,00	0,09	0,90	0,09
Somme esters			9,20	0,82	9,30	0,75

a: Ferreira *et al.* (2000), dans solution modèle proche du vin

b: Escudero *et al.* (2007), dans solution modèle proche du vin

c: Pineau (2007), dans vin désaromatisé

d: Etievant (1991), dans vin

En conclusion sur cette partie, nous pouvons dire que la co-inoculation *T. delbrueckii* OXT1 1//2 / *S. cerevisiae* X5 a permis de complexifier la composition aromatique d'un moût blanc sec issu du cépage Sauvignon blanc et d'un moût rosé de cépage Merlot tout en ayant des cinétiques fermentaires très proches de la fermentation réalisée uniquement avec la souche *S. cerevisiae* X5. En effet, sur le blanc sec la co-inoculation a permis d'augmenter la production d'esters fermentaires de 25%, de phényl-2-éthanol de 51% et de thiols volatils de 31%. Dans les mêmes conditions, sur moût rosé, la production totale d'esters n'a pas été augmentée contrairement à la production de phényl-2-éthanol augmentée de 36%.

V Développement d'un fermenteur à double compartiment

Le moût de raisin est un écosystème contenant de nombreux micro-organismes qui interagissent entre eux. Il y a de nombreux types d'interactions définis par différents termes mais en œnologie l'interaction est souvent considérée comme l'inhibition ou l'augmentation de la croissance d'une population par une autre (Fleet, 2003). Il est donc indispensable pour évaluer les interactions entre microorganismes de pouvoir les quantifier précisément.

Il existe de nombreux mécanismes d'interactions entre levures comme l'inhibition par production d'éthanol, d'acides gras à courtes chaînes, de toxines « killer » et d'autres composés toxiques, la limitation nutritionnelle ou compétition de substrats, l'inhibition physique de type « cell-cell » contact ou encore la compétition pour l'espace. Ses mécanismes d'interactions sont souvent associés à l'inhibition des levures non-*Saccharomyces* par *S. cerevisiae* mais nous avons vu précédemment que des levures non-*Saccharomyces* pouvaient également inhiber *S. cerevisiae* et d'autres levures non-*Saccharomyces*. Par ailleurs, il est important de rappeler que l'effet de ces mécanismes d'interactions n'est pas toujours négatif et peut être profitable aux différents types de microorganismes (Siewverts et al., 2008).

Dans ce contexte, nous avons décidé de développer un outil permettant l'étude des interactions entre levures (basée notamment sur le suivi de leur croissance) au cours de la fermentation alcoolique du vin : un fermenteur à double compartiment permettant une séparation physique des microorganismes.

Un double bioréacteur à membrane basé sur le même principe a déjà été développé, par une autre équipe de chercheurs (Albasi et al., 2001 ; Pommier et al., 2002 ; Manjarrez et al., 2000). Cet outil, présenté sur la figure 63 repose sur le principe suivant : deux micro-organismes différents sont confinés dans des compartiments séparés par une membrane à fibres creuses mais évoluent dans le même milieu de culture grâce à une circulation

alternative de ce milieu d'un compartiment à l'autre. La circulation du milieu à travers la membrane de filtration à fibres creuses est assurée par surpression (0,7 bar) et contrôlée par des sondes à niveau. De l'air comprimé est introduit alternativement dans l'espace tête d'un réservoir, alors que le deuxième reste ouvert à l'atmosphère. Il en résulte une différence de pression transmembranaire qui induit un déplacement du milieu d'un compartiment vers l'autre. L'entrée et la sortie des gaz dans chaque compartiment sont contrôlées par un couple d'électrovannes. Un dispositif permet de basculer la mise sous tension entre les deux couples de vannes en fonction du niveau de liquide dans les deux réservoirs. Le niveau maximum est fixé pour chacun des réservoirs par deux sondes de niveau en acier inoxydable : lorsque les deux sondes sont en contact avec le liquide, le système de contrôle fait basculer la mise sous tension des vannes. Les vannes qui étaient ouvertes se ferment et celles qui étaient fermées s'ouvrent. Le réservoir qui était à pression atmosphérique passe en surpression et celui qui était en surpression passe alors à pression atmosphérique.

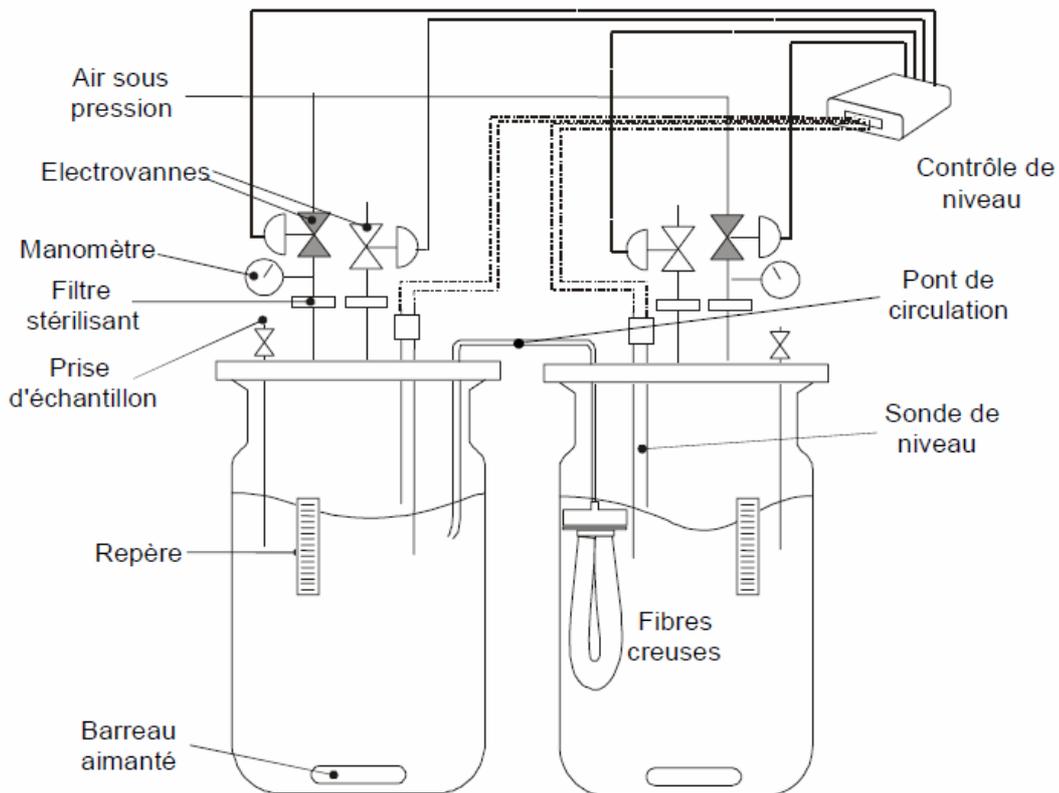


Figure 63 : Schéma du double bioréacteur à membranes d'Albasi *et al.* (2001).

1 Objectifs et intérêts

Le fermenteur à double compartiment est développé dans le but de faciliter l'étude des interactions entre levures au cours de la fermentation alcoolique, c'est-à-dire d'acquérir un outil permettant un suivi simple et rapide de la concentration cellulaire de 2 microorganismes. Il permet donc d'étudier les phénomènes d'inhibition entre levures au cours de la fermentation alcoolique dont l'inhibition de type « cell-cell contact ». Pour cela, il suffit de comparer les croissances des 2 populations qui sont séparées physiquement avec celles obtenues dans un fermenteur simple où les populations sont mélangées. Cet outil a également un autre objectif, plus industriel, qui est d'optimiser les protocoles d'inoculation mixte et d'établir des couples de levures performants afin de mieux maîtriser les co-inoculations. De plus, cet outil, développé dans le cadre de cette thèse pour l'étude des interactions entre les espèces *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, pourra également être utilisable pour l'étude entre d'autres espèces de levures, entre 2 souches de la même espèce (intra-espèce) mais également entre 2 types de microorganismes différents comme par exemple les levures et les bactéries.

Le principe du fermenteur à double compartiment est basé sur la séparation physique de 2 microorganismes (un dans chaque compartiment) tout en conservant l'homogénéité du milieu de culture entre les 2 compartiments pour se rapprocher le plus possible des conditions « réelles » où les 2 microorganismes évoluent dans le même milieu. La séparation physique des 2 microorganismes permet de suivre facilement l'évolution de leurs concentrations cellulaires sans changer les techniques de dénombrement utilisées en culture pure. En effet, en présence de culture pure de levures, l'utilisation conjointe du compteur à particules pour déterminer la concentration cellulaire et du bleu de méthylène pour estimer la viabilité cellulaire nous donne facilement accès à la concentration en cellules viables par millilitre. Cependant, dans le cas de cultures mixtes, la détermination de la concentration cellulaire viable de chaque population de levure est beaucoup plus délicate. En effet, l'utilisation du compteur à particules permet d'estimer la population totale du mélange mais ne permet pas de calculer la concentration individuelle des 2 levures. Dans le cas du mélange *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* il est ainsi impossible pour l'appareil, malgré leur différence de taille, de compter l'intégralité d'une population sans compter une partie de l'autre. Même en déplaçant les bornes d'analyse, permettant la sélection de la taille des cellules à compter, il y a toujours un chevauchement des 2 populations (figure 32). L'acquisition récente par le laboratoire d'un cytomètre de flux, permettant le comptage et la différenciation des microorganismes selon leur taille et leur granulosité, n'a pas résolu notre problème puisque il y a aussi des

chevauchements entre les 2 populations. Nous avons également essayé d'autres techniques pour compter distinctement ces 2 types de levures dans un mélange. La PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques (Zott *et al.*, 2010) permet de les quantifier distinctement dans des gammes de concentration de 10^2 à 10^7 cellules/mL, mais nous nous sommes heurtés à des problèmes de spécificité des amorces et de reproductibilité dues aux fortes concentrations de levures au cours de la fermentation alcoolique. De plus, cette technique donne accès à la concentration totale d'une population donnée mais pas à sa population viable, paramètre très important pour l'étude des interactions. Quatre autres inconvénients relatifs à cette technique peuvent être cités : son coût relativement élevé, la lourdeur des manipulations, l'absence d'amorces spécifiques pour le couple de levures utilisé et enfin un décalage dans le temps des résultats par rapport au prélèvement dans le réacteur. Nous avons également essayé une autre technique, engendrant aussi des manipulations assez lourdes mais permettant d'évaluer la concentration cellulaire viable : le dénombrement sur milieux gélosés avec 2 milieux différents. En effet, le premier milieu utilisé (YPDA ou levure totale) permet la quantification de la somme des 2 populations, tandis que le deuxième milieu est un milieu sélectif permettant uniquement la croissance, et donc la quantification, des levures de l'espèce *T. delbrueckii*. La détermination de la concentration cellulaire de la population *S. cerevisiae* est alors obtenue par soustraction de la concentration obtenue sur le premier milieu par celle obtenue sur le milieu sélectif. Dans notre cas, c'est-à-dire pour l'étude des interactions entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, la mise au point du milieu sélectif est particulièrement laborieuse et doit être adaptée en fonction de la souche de *T. delbrueckii* et de *S. cerevisiae* utilisées (Chapitre IV.3.2, partie Matériels et Méthodes). De plus, les résultats obtenus sont cultures dépendants ce qui peut être une source d'erreurs surtout lorsque les microorganismes doivent se développer sur 2 milieux différents. Enfin, la quantification par étalement sur milieux gélosés donne des résultats au minimum 48h après analyse. Par ailleurs, si l'on désire étudier les interactions entre 2 souches d'une même espèce, voir du même genre, le dénombrement sur milieux gélosés, par PCR quantitative, par l'utilisation de compteur à particules ou d'un cytomètre de flux, peut s'avérer encore plus difficile, voir impossible. Dans ces conditions, où aucune des méthodes précédentes ne permet une quantification rapide et simple, la séparation physique des 2 types de populations apparaît comme la solution idéale pour quantifier séparément et facilement la concentration cellulaire viable de 2 levures différentes.

Pour évaluer les interactions entre levures, outre les concentrations cellulaires, il est important de suivre finement les cinétiques de fermentations. Notre fermenteur à double compartiment a donc été conçu pour être aussi utilisable sur l'installation actuelle du laboratoire, permettant le

suivi automatisé des fermentations alcooliques par mesure en temps réel de la perte de poids due au dégagement de CO₂ (Chapitre III/2/2, partie Matériels et Méthodes). Ce suivi automatisé, effectué toutes les 20 minutes, nous permet de calculer finement la vitesse de fermentation instantanée. Le volume des fermenteurs actuels est de 1,4 L (1,2L de milieu). Le volume du fermenteur à double compartiment est de 1,4 L par compartiment soit 2,8 L (2,4 L de milieu). Grâce à ce volume important nous pouvons réaliser de nombreux prélèvements pendant la réaction sans trop perturber le ratio volume air / volume du milieu.

2 Contraintes de fonctionnement initiales

Nous avons développé le fermenteur à double compartiment, aussi appelé « double fermenteur » ou encore « fermenteur double » pour qu'il soit le plus simple possible. Cependant, nous avons dû tenir compte dans son développement de certaines contraintes de fonctionnement qu'il impose. Initialement, les contraintes de fonctionnement étaient uniquement liées à une séparation physique efficace des 2 types de micro-organismes étudiés, une bonne homogénéité du milieu dans les 2 compartiments sans décalage dans le temps et la stérilité vis-à-vis des contaminations extérieures. Une autre contrainte, liée à son intégration dans l'installation automatisée du laboratoire, est le fait qu'il doit être posé sur une balance de précision sans en perturber le fonctionnement.

L'apparition de difficultés matérielles et techniques nous a conduit à faire des choix technologiques qui ont eux même engendré de nouvelles contraintes de fonctionnement mais aussi à l'aboutissement d'un outil performant mais plus « complexe » qu'initialement prévu.

3 Etapes de développement

Le développement de ce fermenteur a été réalisé durant les 3 années de thèse parallèlement aux autres études menées, en collaboration avec l'équipe du Professeur Martine Mietton-Peuchot de notre UMR (Unité mixte de recherche). La première étape de son développement a été de dessiner les plans du fermenteur double, avec la participation de notre verrier (Atelier Prémont, Bordeaux), en partant du principe qu'il devait permettre une séparation physique de 2 microorganismes et qu'il devait respecter les contraintes de fonctionnement détaillées au paragraphe précédent.

3.1 Conception

Après mure réflexion, nous avons conçu un fermenteur en verre à double compartiment circulaire avec séparation interne des 2 compartiments par une membrane de filtration (figure 64). Les 2 compartiments sont maintenus et serrés l'un contre l'autre par une bride en aluminium permettant d'éviter toute fuite du milieu. Chaque compartiment a une contenance de 1,4 L qui une fois rempli avec 1,2 L de milieu donne un rapport volume d'air / volume de liquide similaire aux fermenteurs simples (non compartimentés) couramment utilisés au laboratoire.

Ce double fermenteur dispose également, par compartiment, d'une cloche permettant le dégagement du CO₂ formé au cours de la fermentation alcoolique et d'un orifice avec septum sur le devant de chaque compartiment permettant des prélèvements stériles. Un des compartiments est également doté d'un tube en verre ouvert vers l'extérieur pour l'installation de la sonde de température.

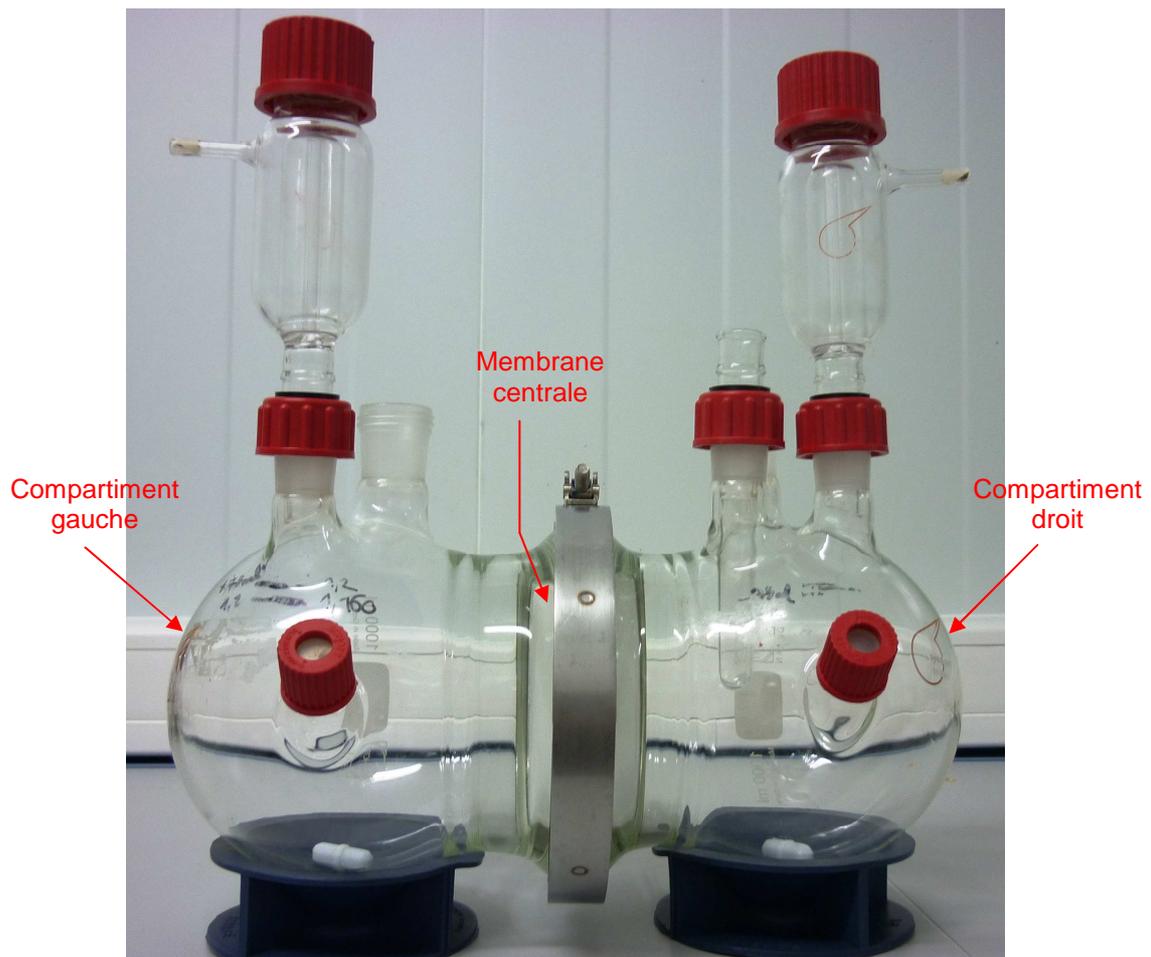


Figure 64 : Fermenteur à double compartiment vu de face.

3.2 Choix de la membrane interne

Initialement, dans un souci de simplicité, nous avons essayé de voir si l'homogénéisation du milieu entre les 2 compartiments était possible par simple diffusion à travers la membrane de filtration centrale facilitée par l'agitation magnétique de chaque compartiment (un agitateur magnétique par compartiment).

Notre premier souci a donc été le choix de la membrane de filtration centrale qui doit permettre le passage du milieu de fermentation tout en retenant les microorganismes.

Afin de pouvoir évaluer un grand nombre de membranes constituées de différentes matières (nylon hydrophile, polysulfone hydrophile, polyestersulfone hydrophile, acétate de cellulose, ester de cellulose...) et de différentes tailles de pores (entre 0,2 et 1,2 μm) nous avons mis au point un test préliminaire simple consistant à remplir un seul compartiment avec du milieu synthétique MS et à observer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre des niveaux entre les 2 compartiments. Grâce à ce test nous avons sélectionné 5 membranes sur la vingtaine testées permettant un équilibre des niveaux de milieu entre 15 et 45 minutes sachant que certaines membranes « imperméables » au milieu MS n'ont permis aucun équilibre après 24h. Ces membranes sont : 2 membranes filtrantes Tuffryn[®] en polysulfone hydrophile avec taille de pores 0,2 et 0,45 μm , 2 membranes Magna en ester de cellulose avec taille de pores 1,2 et 0,45 μm et enfin une membrane en acétate de cellulose avec taille de pores de 0,45 μm .

Ces 5 membranes ont alors été utilisées pour le test suivant, qui consiste à remplir les 2 compartiments toujours avec le milieu MS stérile et à ensemencer avec des levures un seul des 2 compartiments. Le but de cette expérience est de vérifier si les membranes permettent facilement le passage des constituants du milieu en fermentation d'un compartiment vers l'autre, sans trop de décalage dans le temps. Pour cela, des dosages d'éthanol, de sucres, d'azote assimilable ainsi que d'acidité volatile ont été effectués sur 48h dans les 2 compartiments. Toutes les membranes ont entraîné des différences importantes entre la composition des 2 milieux. La membrane la plus « performante » entraîne un décalage dans le temps de la composition du milieu d'environ 12 heures entre le compartiment ensemencé qui évolue rapidement (enrichissement en éthanol et AV, appauvrissement en sucres et en azote) contrairement au milieu non ensemencé plus proche de la composition initiale du milieu MS. Suite à cette expérience, la membrane Magna en ester de cellulose de porosité de 0,45 μm , a été retenue pour le reste de la mise au point du fermenteur.

Nous avons également dû réfléchir à un moyen permettant une meilleure homogénéisation entre les 2 compartiments car ce décalage de 12 heures n'est pas satisfaisant. En effet, il

engendrerait de grandes différences dans la composition du milieu, notamment en début de fermentation où la vitesse de fermentation est très élevée.

3.3 Nouveau système d'homogénéisation : pompe péristaltique

Deux systèmes nous sont venus à l'esprit pour améliorer l'homogénéisation du milieu entre les 2 compartiments : la mise sous pression du fermenteur ou l'utilisation de pompes. La mise sous pression des compartiments, comme c'est le cas dans le double bioréacteur à membrane d'Albasi *et al.* (2001), ne nous a cependant pas paru envisageable, dans notre cas, car le suivi des cinétiques de fermentation doit être réalisé par suivi de la perte du poids due au dégagement de CO₂ qui serait grandement perturbé avec une mise sous pression. Nous avons donc opté pour une homogénéisation du milieu par l'intermédiaire d'une pompe. Notre choix s'est alors directement porté sur une pompe péristaltique. En effet, ce genre de pompe permet de travailler sur des petits volumes et présente surtout l'avantage d'éviter tout contact direct entre le milieu et la pompe. En effet, le liquide circule à l'intérieur de tuyaux souples écrasés par des rouleaux. Le volume de liquide incompressible est ainsi déplacé de l'aspiration vers le refoulement à un débit qui dépend du diamètre du tube souple, du nombre de tubes et de la vitesse de rotation du rotor.

La pompe péristaltique choisie est une pompe de laboratoire (Minipuls 3, Gilson, France). Les tubes utilisés sont en PVC (polyvinyl chloride) et présentent un diamètre interne de 3,16 mm permettant d'obtenir un débit maximal de 29 ml/min pour la vitesse de rotation maximale de la pompe qui est de 48 rpm. Ces tubes présentent l'avantage d'être autoclavables, transparents, peu coûteux et d'être disponibles dans le diamètre maximal utilisable pour notre tête de pompe (obtention du débit maximum pour notre tête de pompe).

L'utilisation de cette pompe péristaltique permet d'aspirer, par exemple, le milieu du compartiment droit et de le rejeter dans le gauche par l'intermédiaire d'un tube. Notre pompe péristaltique étant équipée d'une tête de pompe multicanaux elle permet simultanément d'aspirer le milieu du compartiment gauche et de le rejeter dans le droit par l'intermédiaire d'un autre tube afin de mélanger un maximum de milieu en peu de temps. Ceci est un autre avantage lié à l'utilisation d'une pompe péristaltique. De plus, l'utilisation de tuyaux de diamètre et longueur identiques, installés autour d'un même rotor, permet d'obtenir des débits rigoureusement identiques entre les 2 compartiments.

Cependant, si les mouvements de milieu d'un compartiment à l'autre sont rendus possibles par l'utilisation d'une pompe, il faut également assurer la séparation physique des 2 types de levures. L'aspiration et le refoulement d'un compartiment à l'autre doit donc se faire par l'intermédiaire d'un système de filtration qui sera détaillé ci-dessous (Chapitre V.3.4, partie Résultats et Discussion). Par ailleurs, l'utilisation d'une pompe péristaltique a engendré la nécessité de réaliser des modifications sur le fermenteur. Deux petites pièces en verres spécifiques ont été rajoutées pour connecter les tuyaux sur le dessus du fermenteur (2 tuyaux par compartiments).

3.4 Choix du système de filtration : capsules de filtration

Le couplage du double fermenteur à une pompe péristaltique a entraîné la nécessité d'utiliser un système de filtration (en plus de la membrane centrale) pour retenir les microorganismes lors de l'aspiration et du reflux du milieu d'un compartiment à l'autre. Le choix des filtres a été très difficile car ils doivent pouvoir supporter la filtration pendant 2 à 3 semaines d'un milieu chargé en levure, ce qui entraîne des problèmes de colmatage, et permettre un débit suffisamment important pour obtenir une bonne homogénéisation du milieu de fermentation entre les 2 compartiments.

Nous avons essayé différents types de filtres comme des fibres creuses, des gros filtres seringues et des capsules de filtration. Des mesures de débits ont été réalisées avec de l'eau, du milieu synthétique et enfin du milieu synthétique additionné en levures.

Les fibres creuses présentent le gros avantage d'avoir une surface de filtration très élevée. Cependant, les débits obtenus avec de l'eau et pour une vitesse de rotation maximale de la pompe, sont vraiment faibles, c'est-à-dire de l'ordre de 1mL/minute. Ce type de filtre n'a donc pas été retenu.

Les filtres seringues présentent l'avantage de permettre un débit très important (quasiment identique au débit sans filtre) avec de l'eau et le milieu synthétique, mais leur faible surface de filtration (jusqu'à 20 cm²) engendre très rapidement des problèmes de colmatage lors de la filtration de milieu synthétique chargé en levures, soit quelques minutes.

L'utilisation de capsules de filtration caractérisées par une surface de filtration très élevée a donné des résultats beaucoup plus satisfaisants, c'est-à-dire des débits élevés et des durées avant colmatage très importantes. Le choix des capsules de filtration est assez vaste notamment en terme de composition de la membrane de filtration à l'intérieur de la capsule mais également en terme de surface de filtration qui peut varier de 150 à 1000 cm².

Cependant, plus la surface de filtration augmente, plus le volume mort à l'intérieur de la capsule augmente. Ces capsules, dans leurs applications courantes, fonctionnent par « reflux », c'est-à-dire par remplissage de la capsule avec le milieu à filtrer qui traverse la membrane à l'intérieur de la capsule et ressort de l'autre côté. Il est par ailleurs possible d'utiliser ces capsules en sens inverse, c'est-à-dire en aspirant le milieu à travers la capsule. Il est cependant important de noter que lors de l'utilisation d'une capsule filtrante par « aspiration » la surface de filtration est alors plus limitée.

Nous avons essayé plusieurs types de capsule: Polycap 36 AS avec membrane en nylon de 400 cm^2 et de porosité de $0,45 \mu\text{m}$, Polycap 75 AS avec membrane en nylon de 820 cm^2 et de porosité de $0,2 \mu\text{m}$, et enfin Sartobran 150 et 300 avec membrane en acétate de cellulose de 150 cm^2 et 300 cm^2 respectivement, et de porosité de $0,45 \mu\text{m}$). Notre choix s'est arrêté sur la capsule de filtration Sartobran 300 avec membrane en acétate de cellulose de porosité égale à $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius, France). Cette membrane est caractérisée par une surface de filtration élevée de 300 cm^2 et un volume mort relativement faible d'environ 30 mL . Les débits obtenus lors de la filtration du milieu synthétique par reflux et aspiration à travers cette capsule sont présentés sur la figure 65. On peut voir sur ce graphe que, quand la vitesse de rotation de la pompe augmente, le débit augmente linéairement que ce soit par aspiration ($R^2 = 0,9999$; $p = 0,015$) ou par reflux à travers la capsule de filtration ($R^2 = 0,9993$; $p = 0,0079$). De plus, les débits par aspiration ou reflux sont similaires pour une même vitesse de rotation de la pompe. Il est important de signaler que le débit maximal obtenu à travers la capsule, soit environ 26 mL/min pour la vitesse de rotation maximale de la pompe (48 rpm), est proche du débit maximal obtenu sans capsule, soit 29 mL/min .

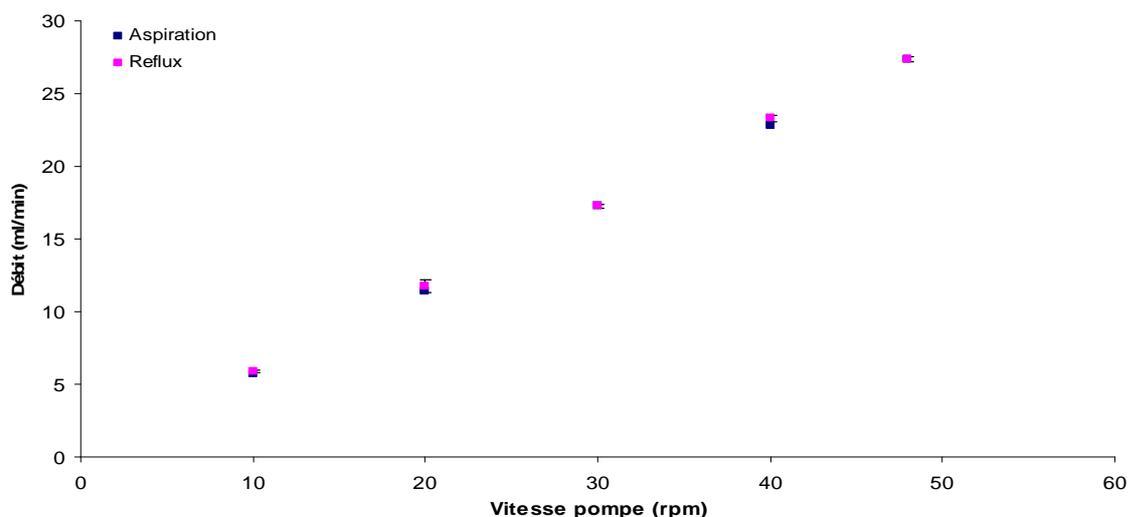


Figure 65 : Débits obtenus lors de la filtration du milieu synthétique MS par reflux et aspiration à travers la capsule de filtration Sartobran 300 pour différentes vitesses de rotation de la pompe. Moyennes de 3 répétitions.

L'évolution du débit dans le temps, avec le milieu synthétique non additionné en levures, pour une vitesse de rotation de la pompe fixe, a également été évaluée. On peut voir sur la figure 66 que le débit par reflux à travers la capsule de filtration du milieu MS est stable sur une durée de 4h pour trois vitesses de rotation de la pompe différentes (30, 40 et 48 rpm). La figure 67 présente des résultats similaires pour l'aspiration à travers la capsule.

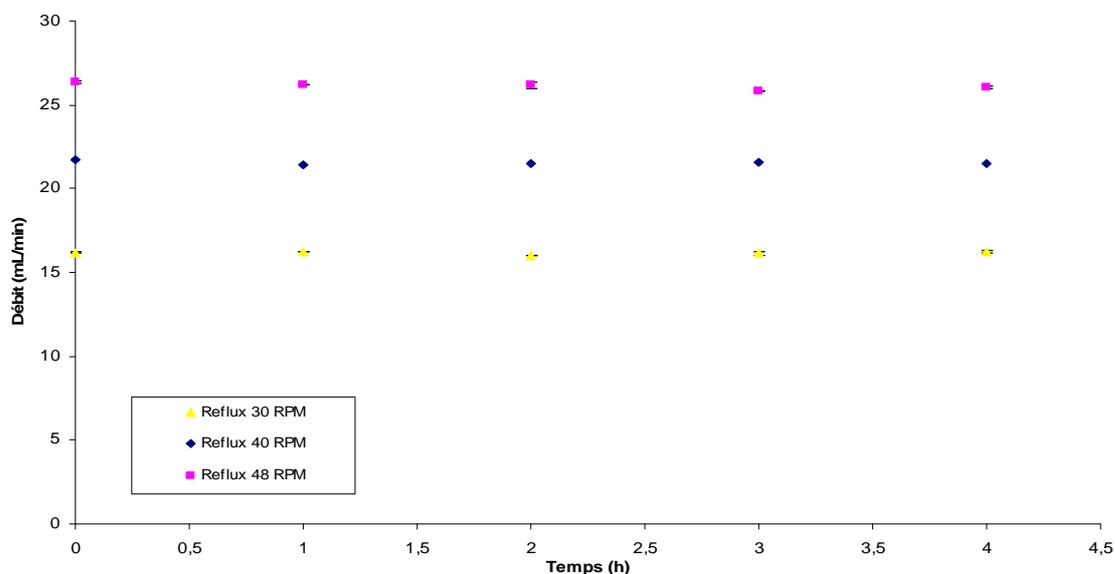


Figure 66 : Débits obtenus au cours du temps par reflux à travers la capsule de filtration Sartobran 300 du milieu MS pour différentes vitesses de rotation de la pompe. Moyennes de 3 répétitions.

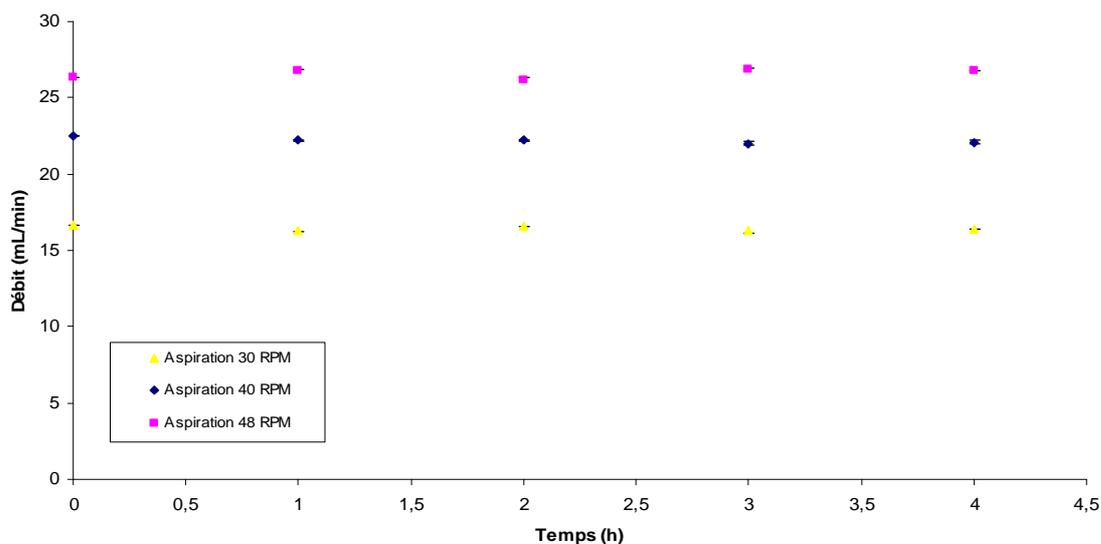


Figure 67 : Débits obtenus au cours du temps par aspiration à travers la capsule de filtration Sartobran 300 du milieu MS pour différentes vitesses de rotation de la pompe. Moyennes de 3 répétitions.

L'évolution du débit dans le temps, par reflux à travers la capsule de filtration du milieu MS additionné en levures (environ 2.10^8 cellules/mL, turbidité > 2000), pour une vitesse de rotation maximale de la pompe (48 rpm) est présentée sur la figure 68. Une connexion en « T » a permis pour cette expérience de suivre la pression à l'entrée de la capsule de filtration à l'aide d'un baromètre. Après quasiment 1h30, le débit est toujours parfaitement linéaire, mais après 3 h sans interruption le débit commence à diminuer et la pression à l'entrée de la capsule de filtration commence à augmenter puisqu'ils passent respectivement de 26 à 24,4 mL/min et de 0,08 à 0,6 bar. Après un peu plus de 4h, le débit a encore diminué, passant à 21,6 mL/min et la pression a encore augmentée pour atteindre 1,3 bar. Quelques minutes plus tard, la pression à l'entrée de la capsule a entraîné des fuites dans le système et l'expérience a dû être arrêtée. Dans les mêmes conditions, les problèmes de surpression dus au colmatage de la capsule de filtration interviennent après environ 1h lorsque le milieu est filtré par aspiration par la capsule (données non présentées). Cette différence de temps est tout à fait normale car la surface de filtration est plus faible lorsque la capsule est utilisée dans ce sens.

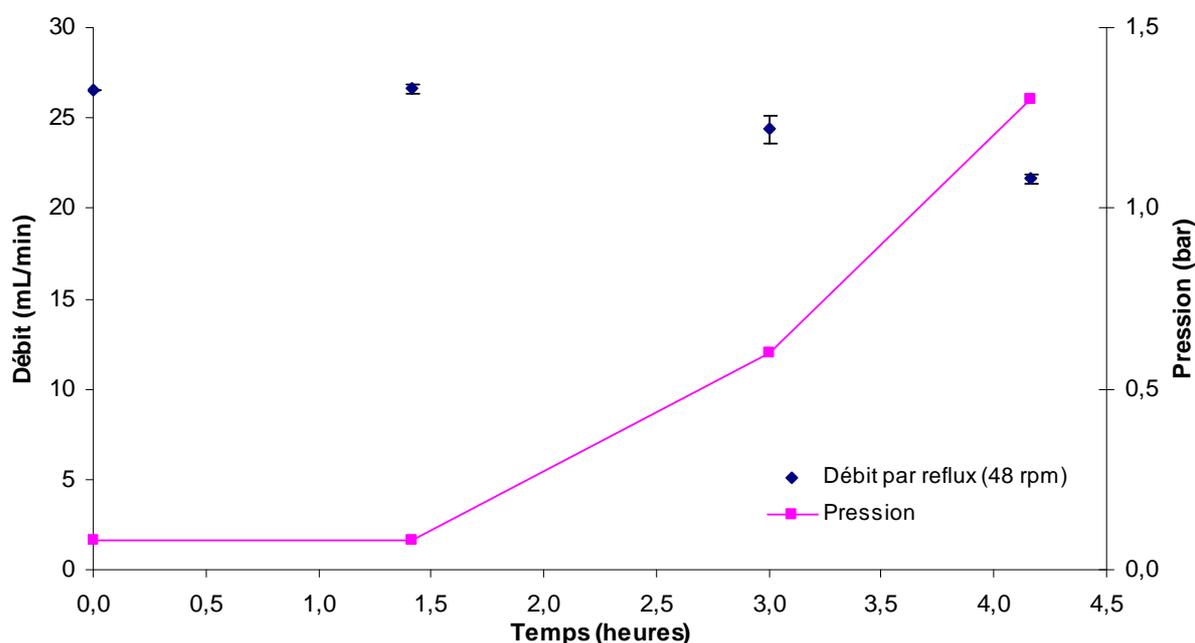


Figure 68 : Débits et pression au cours du temps obtenus par reflux à travers la capsule de filtration Sartobran 300 du milieu MS additionné en levures pour une vitesse de rotation de la pompe de 48 rpm. Moyennes de 3 répétitions.

Cette expérience, dans des conditions extrêmes (milieu très chargé, vitesse de rotation de la pompe maximale et durée d'expérience importante) nous a permis d'observer les limites de notre système. En effet, la filtration en continu d'un milieu très chargé en levures engendre des problèmes de colmatage de la capsule de filtration malgré sa grande surface de filtration (300 cm² par reflux). De plus, l'accumulation de levures à l'intérieur de la capsule, sur des durées prolongées, induit une diminution de la concentration cellulaire en levures du milieu contenu dans les compartiments.

Nous avons donc dû réfléchir à un moyen permettant la diminution des phénomènes de colmatage.

3.5 Pilotage de la pompe

Nous avons vu précédemment que le fonctionnement en continu de la pompe péristaltique couplé à une capsule de filtration entraîne des problèmes de colmatage et d'appauvrissement du milieu en levures.

Une des solutions serait donc de ne pas utiliser la pompe en continu pour limiter l'accumulation des levures dans les capsules de filtration. Nous avons donc fait concevoir un logiciel de pilotage spécifiquement pour notre pompe par la société Alliance Automation (Talence, France). Ce logiciel permet automatiquement d'arrêter ou d'actionner la pompe à la demande mais aussi de contrôler la vitesse et le sens de rotation de la pompe. Nous avons donc mis au point un cycle comprenant des arrêts et des changements de sens de rotation de la pompe. Le fait de changer le sens de rotation de la pompe permet de passer d'une filtration par reflux à l'intérieur de la capsule à une filtration par aspiration à travers la capsule. Ce phénomène de contre-courant présente le gros avantage d'éviter tout colmatage de la capsule. La stabilité du débit dans le temps, avec un milieu chargé en levure, a été évaluée dans ces nouvelles conditions, c'est-à-dire en réalisant des changements de sens de rotation de la pompe. Dans ces conditions, nous n'avons constaté aucun colmatage et aucun appauvrissement du milieu en levures pendant les 4h d'expérience (données non présentées). L'efficacité de ce système sur l'homogénéisation des milieux contenus dans les 2 compartiments du double fermenteur, ainsi que sur la séparation des 2 levures sera démontrée au Chapitre V.4.1, de la partie Résultats et Discussion.

3.6 Surpoids du dispositif et conséquences

Initialement, comme nous l'avons dit précédemment, le fermenteur à double compartiment ne devait pas être associé à une pompe péristaltique. Cette association, outre les problèmes de filtration, a également entraîné un problème de poids. En effet, pour être opérationnel et obtenir des mesures fines du dégagement de CO₂, il faut absolument pouvoir mesurer précisément le poids du fermenteur. Or, le poids de la pompe plus celui du double fermenteur rempli avec 2,4 L de milieu est supérieur à la capacité de 4,2 kg des balances intégrées à l'installation automatisée. Nous avons essayé de suivre le poids du fermenteur en posant la pompe à côté de la balance, mais les mouvements de fluide à l'intérieur des tuyaux reliant le fermenteur à la pompe péristaltique perturbent trop la mesure qui doit être précise au 1/100 de gramme. Aussi, afin d'éviter ces perturbations, la seule solution envisageable a été d'acheter une nouvelle balance acceptant le poids total du dispositif (13kg), toujours avec la même précision, ce qui a engendré une dépense supplémentaire non négligeable. Cette balance (Signum 1 Supreme, Sartorius mechatronics) de capacité maximale de 16kg est opérationnelle et permet aujourd'hui la mesure précise du poids du fermenteur à double compartiment. Cependant, le poids important posé sur la balance, ainsi que les fils d'alimentation de la pompe péristaltique et des 2 agitateurs magnétiques, entraîne une légère dérive du poids du système. Cette dérive, légèrement plus importante que pour les fermenteurs simples habituellement utilisés, est prise en compte dans le calcul de la cinétique de fermentation. Le fermenteur à double compartiment a ainsi atteint le stade final de son développement (figure 69).

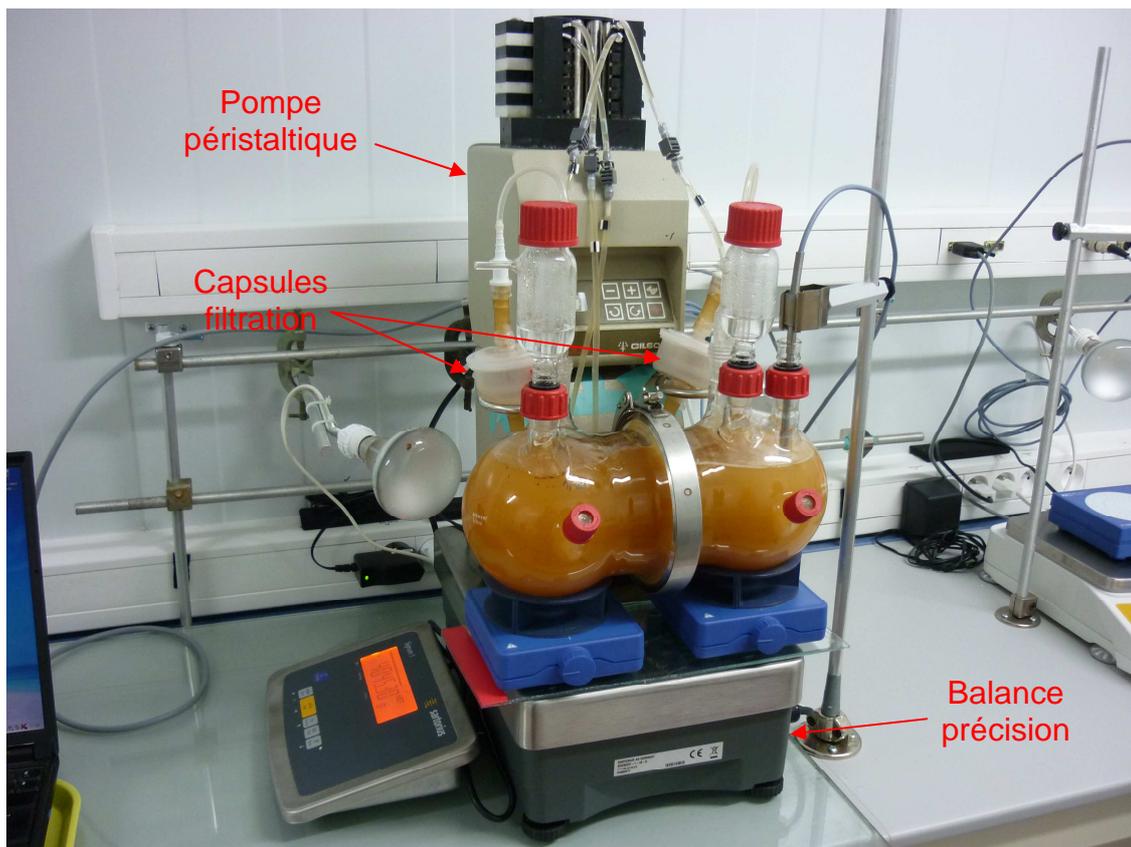


Figure 69 : Fermenteur à double compartiment dans sa version finale, sur installation automatisée.

4 Validation du fermenteur

Après le développement du fermenteur double, une série d'expériences a été nécessaire pour valider ce dernier. En effet, il est important de vérifier d'une part le respect des différentes contraintes de fonctionnement, et d'autre part, de comparer les évolutions de dégagement de CO_2 et de la croissance obtenues avec le double fermenteur avec celles obtenues avec un fermenteur « simple » couramment utilisé dans le laboratoire.

Les contraintes de fonctionnement imposées lors de la conception de ce fermenteur étaient :

- une absence de contamination entre les 2 compartiments, c'est-à-dire une séparation physique des 2 populations efficace ;
- une absence de contaminations extérieures, c'est-à-dire la « stérilité » du dispositif
- une bonne homogénéité du milieu (composition du milieu et concentration en cellules) entre les 2 compartiments ;
- et enfin une utilisation compatible avec l'installation automatisée du laboratoire.

4.1 Absence de contaminations entre les compartiments, stérilité du dispositif et homogénéité du milieu

Le but de cette expérience est d'évaluer à la fois l'homogénéité du milieu (composition du milieu), l'absence de contaminations entre les 2 compartiments et l'absence de contaminations extérieures.

Dans cette expérience, le double fermenteur a été rempli de façon stérile avec 1,2 L de milieu synthétique MS (lui-même stérile) dans chacun de ses compartiments. Cependant, seul le compartiment gauche a étéensemencé avec une levure *S.cerevisiae* à 2.10^6 cellules/mL. Le cycle de fonctionnement de la pompe était le suivant : 10 minutes de fonctionnement par reflux à travers les capsules puis 5 minutes d'aspiration par les capsules pour décolmater puis 1h 45 minutes d'arrêt puis reprise du même cycle. Nous avons réalisé des prélèvements durant les 12 jours de l'expérience pour doser les sucres, l'éthanol, l'azote assimilable et l'acidité volatile du milieu, évaluer la croissance de la levure dans le compartiment de gauche et contrôler le maintien de la stérilité du milieu contenu dans le compartiment de droite. Le dégagement du CO₂ n'a pas été suivi dans cette expérience.

Les étalements sur milieu gélosé YPDA ont montré que la levure inoculée dans le compartiment gauche s'est développée jusqu'à atteindre 9.10^7 cellules viables/mL. L'étalement du milieu issu du compartiment droit a permis de conclure à l'absence de contaminations extérieures et l'absence de contamination par la levure présente dans l'autre compartiment. En effet aucune colonie n'a été observée durant la durée de l'expérience.

La figure 70 montre l'évolution de la composition du milieu de fermentation en terme de concentration en azote assimilable, sucres résiduels, d'éthanol et d'AV après 49, 119, 168 et 287h de fermentation dans les 2 compartiments. Cette figure montre très clairement que la composition du milieu des 2 compartiments est similaire dans le temps, ce qui nous permet de conclure que nous avons une bonne homogénéité du milieu dans le fermenteur. De plus, le cycle de la pompe utilisé a permis d'éviter tout colmatage des filtres pendant toute la durée de l'expérience.

En conclusion, l'utilisation du fermenteur à double compartiment, associé à un pilotage de la pompe péristaltique par ordinateur avec un cycle de fonctionnement répété de 10 minutes de reflux par les capsules, 5 minutes d'aspiration par les capsules puis 1h 45 minutes d'arrêt, a permis une bonne homogénéisation du milieu, l'absence de contamination entre les compartiments et un maintien de la stérilité du dispositif vis-à-vis de contaminations extérieures éventuelles.

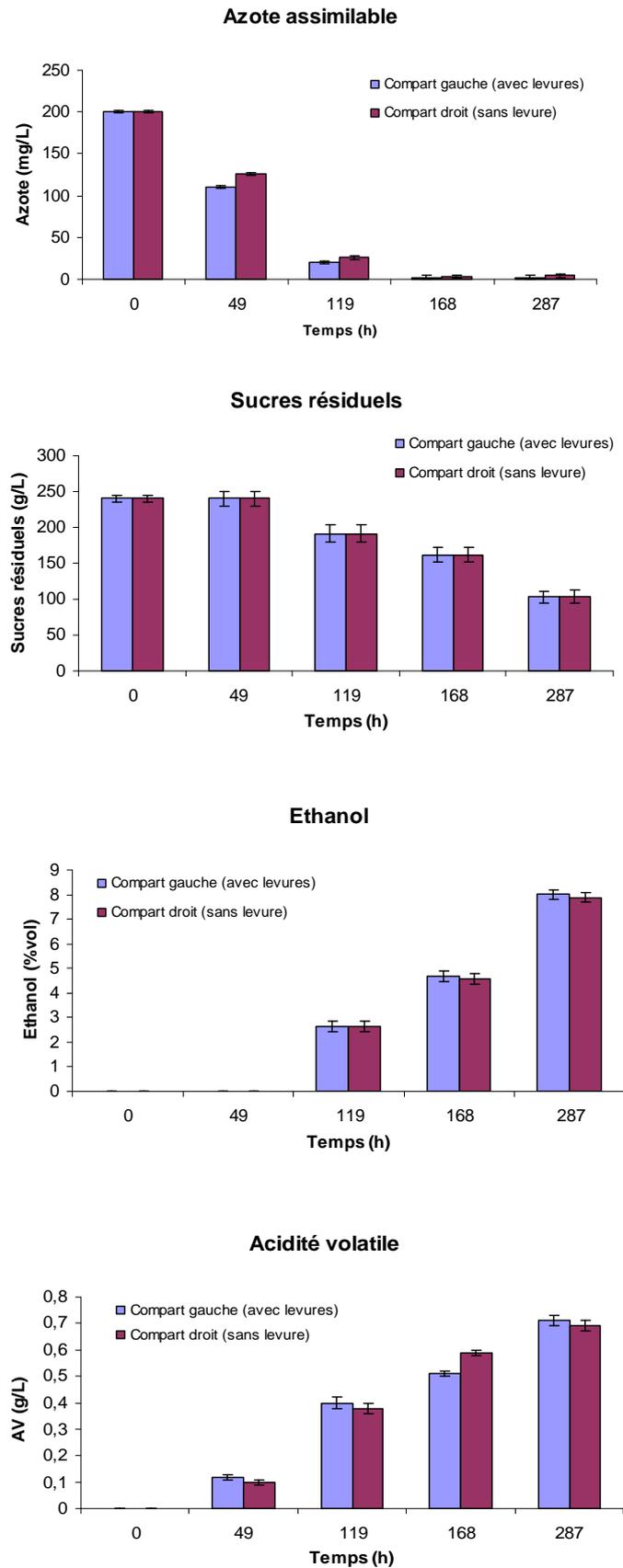


Figure 70 : Evolution de la composition du milieu (azote assimilable, sucres résiduels, éthanol et AV) dans le compartiment gauche (avec levures) et droit (sans levures) du double fermenteur. Moyennes de 2 répétitions.

4.2 Comparaisons fermenteur à double compartiment / fermenteur simple

Le but de cette expérience est, d'une part, de comparer les cinétiques de dégagement de CO₂ du double fermenteur et d'un fermenteur simple et, d'autre part, de vérifier que les croissances dans les 2 compartiments du fermenteur double sont homogènes et similaires à celles obtenues dans un fermenteur simple.

Cette expérience a été répétée 4 fois dans le temps afin d'évaluer la répétabilité des résultats. Le suivi des concentrations cellulaires, par contre, n'a été réalisé que pour 3 des 4 expériences. L'expérience a été réalisée à 24°C sur du jus de raisin blanc commercial ajusté à 215 mgN/L par ajout de thiazote. Le cycle de fonctionnement de la pompe est le même que pour l'expérience précédente. Les 2 compartiments du double fermenteur ainsi que le fermenteur classique sont inoculés à 5.10⁶ cellules viables/mL avec la souche *S. cerevisiae* ST. Pour rappel, les 2 compartiments sont tous les 2 remplis avec 1,2 L de milieu, soit le même volume que pour le fermenteur simple. La quantité de levures inoculée est donc identique.

Différents paramètres cinétiques ont été comparés :

- la durée de la phase de latence (h)
- la vitesse maximale de dégagement de CO₂ appelée V_{max}. (g/L/h) et le temps nécessaire pour atteindre cette vitesse TV_{max} (h)
- la durée de la fermentation (h)
- et enfin la quantité totale de CO₂ dégagé (g/L)

Au cours de cette expérience, nous avons également suivi la population des levures, à l'aide du compteur à particules, et la composition du milieu (sucres résiduels, éthanol, azote assimilable et AV).

Le tableau 24 présente pour les 4 expériences les valeurs moyennes des différents paramètres cinétiques. Les résultats montrent qu'il n'existe pas de différences significatives pour les paramètres étudiés entre le fermenteur simple et le fermenteur double. De plus, pour tous les paramètres, sauf pour le TV_{max}., la répétabilité des résultats est bonne quel que soit le type de fermenteur. En effet, il faut noter que le TV_{max} est compris entre 32 et 35 h pour le fermenteur simple (moyenne de 34 ± 1h) et entre 28 et 40 h (moyenne de 35 ± 5h) pour le fermenteur double.

Tableau 24 : Comparaison du fermenteur à double compartiment et d'un fermenteur simple : étude des paramètres cinétiques.

		Expériences				Moyenne	Ecart type
		1	2	3	4		
Phase latence (h)	Double fermenteur	12	9	12	11	11	1
	Fermenteur simple	12	10	11	11	11	1
V max (g/L/h)	Double fermenteur	1,27	1,33	1,21	1,21	1,25	0,06
	Fermenteur simple	1,30	1,31	1,27	1,22	1,27	0,04
Temps V max (h)	Double fermenteur	33	28	40	38	35	5
	Fermenteur simple	34	32	34	35	34	1
Durée FA (h)	Double fermenteur	128	130	136	133	132	4
	Fermenteur simple	130	131	135	133	132	2
CO ₂ max (g/L)	Double fermenteur	78,3	75,3	75,5	76,4	76,4	1,4
	Fermenteur simple	76,3	75,4	77,8	77,1	76,6	1,0

Pour illustrer les similitudes entre les 2 types de fermenteurs, l'évolution du dégagement de CO₂, la vitesse de dégagement du CO₂ en fonction du temps et en fonction du CO₂ dégagé de l'expérience 4 sont représentées sur la figure 71. On peut cependant remarquer que les courbes des vitesses sont moins « lisses » pour le fermenteur double, ce phénomène étant dû à des oscillations plus importantes de la balance (poids plus important sur la balance).

Le tableau 25 présente, pour 3 des 4 expériences, les concentrations cellulaires obtenues en fin de croissance (X_{max}) et en fin de fermentation (X_f), mesurées dans les compartiments droit et gauche du double fermenteur et dans le fermenteur simple. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative pour les paramètres X_{max} et X_f entre les 2 compartiments et entre les types de fermenteurs. De plus, pour ces 2 concentrations cellulaires, la répétabilité est bonne avec un écart type maximal d'environ 10% ($4,52 \cdot 10^6$ cellules viables/mL) obtenu pour l'estimation de X_{max} dans le compartiment droit.

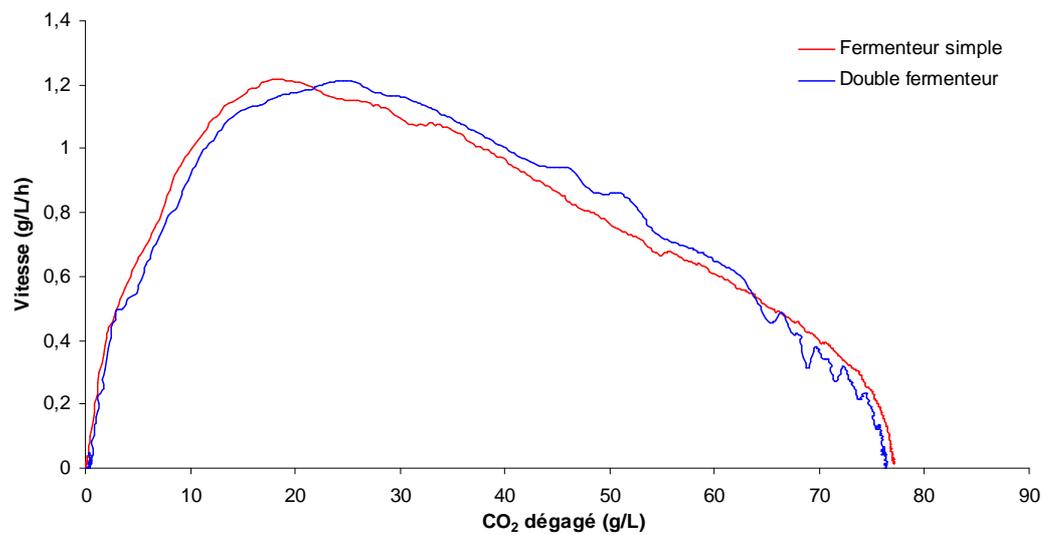
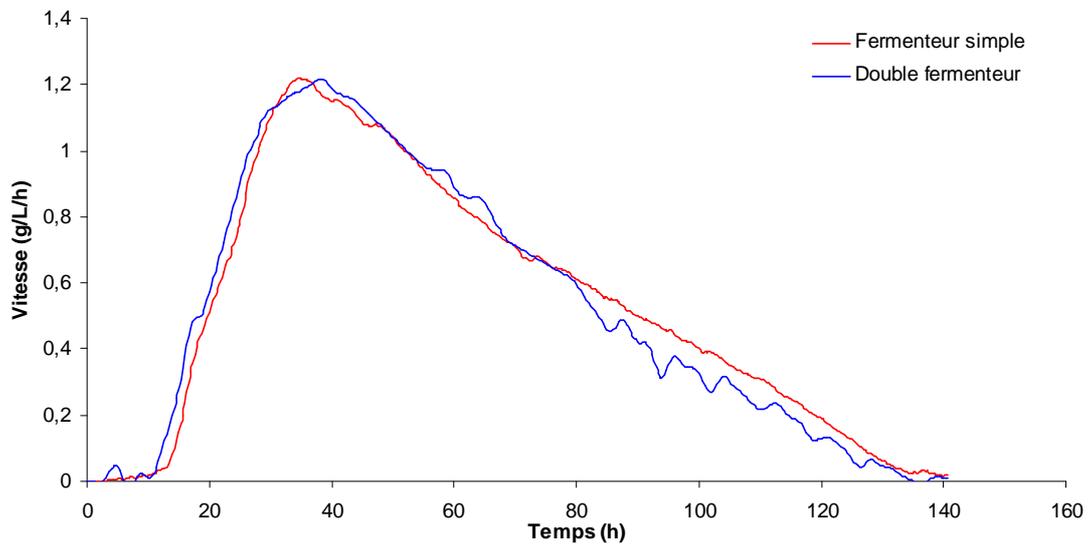
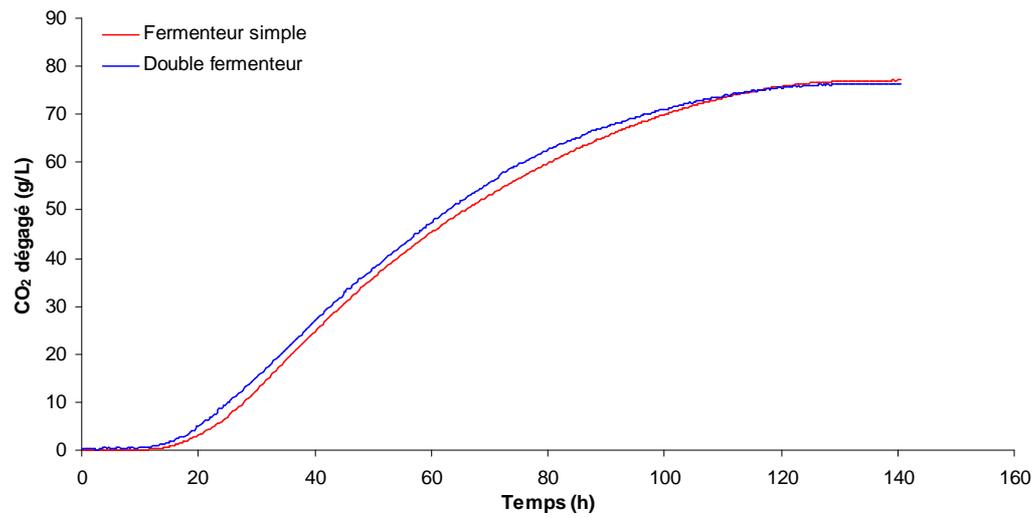


Figure 71 : Cinétiques de fermentations obtenues pour le fermenteur à double compartiment et un fermenteur simple lors de l'expérience n°4.

Tableau 25 : Concentrations cellulaires maximales (X_{max}) et en fin de fermentation alcoolique (X_f) obtenues dans les compartiments droit et gauche du double fermenteur et dans un fermenteur simple.

	X_{max} (cellules viables/mL)				
	1	3	4	Moyenne	Ecart type
Compartiment gauche	$4,72 \cdot 10^7$	$4,55 \cdot 10^7$	$4,41 \cdot 10^7$	$4,56 \cdot 10^7$	$1,57 \cdot 10^6$
Compartiment droit	$4,56 \cdot 10^7$	$4,94 \cdot 10^7$	$4,04 \cdot 10^7$	$4,51 \cdot 10^7$	$4,52 \cdot 10^6$
Fermenteur simple	$4,80 \cdot 10^7$	$4,64 \cdot 10^7$	$4,45 \cdot 10^7$	$4,63 \cdot 10^7$	$1,76 \cdot 10^6$

	X_f (cellules viables/mL)				
	1	3	4	Moyenne	Ecart type
Compartiment gauche	$4,40 \cdot 10^7$	$4,21 \cdot 10^7$	$3,92 \cdot 10^7$	$4,18 \cdot 10^7$	$2,40 \cdot 10^6$
Compartiment droit	$4,27 \cdot 10^7$	$4,52 \cdot 10^7$	$3,86 \cdot 10^7$	$4,22 \cdot 10^7$	$3,34 \cdot 10^6$
Fermenteur simple	$4,67 \cdot 10^7$	$4,60 \cdot 10^7$	$4,09 \cdot 10^7$	$4,46 \cdot 10^7$	$3,16 \cdot 10^6$

La figure 72 représente l'évolution de la concentration cellulaire dans les compartiments droit et gauche du double fermenteur et dans un fermenteur simple au cours de l'expérience n°4. Les trois évolutions sont très similaires, cependant on peut remarquer un petit décalage entre la courbe du compartiment gauche et celle du compartiment droit. Ce léger décalage a été observé dans 2 des 3 expériences réalisées.

La composition du milieu pour les 4 composés analysés, c'est-à-dire l'éthanol, les sucres résiduels, l'azote assimilable et l'AV, est similaire entre les 2 compartiments du double fermenteur et similaire à celle du fermenteur classique pour les 4 expériences (données non présentées). Pour illustrer ce résultat, l'évolution de ces paramètres au cours de l'expérience n°4 est représentée sur la figure 73.

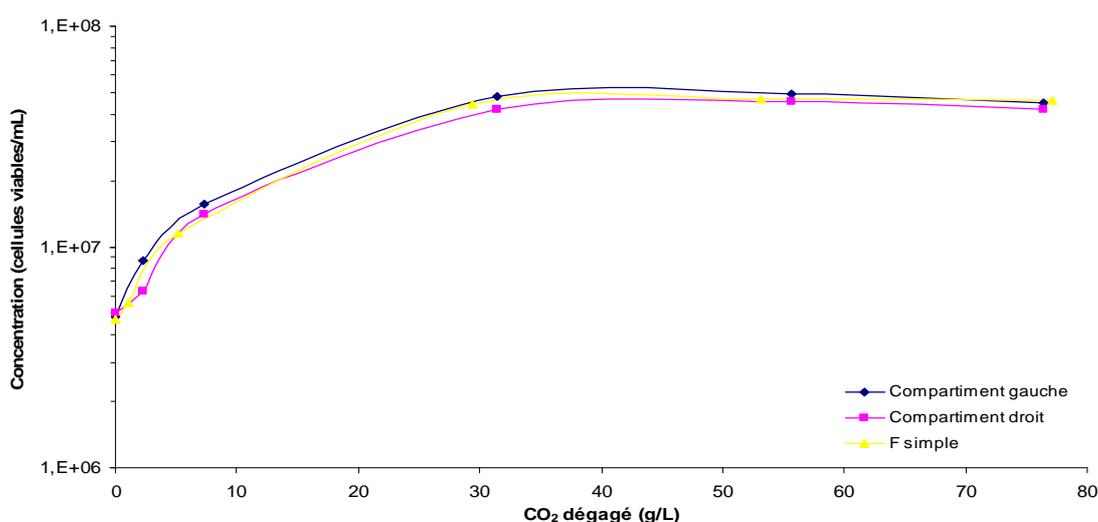


Figure 72 : Représentation logarithmique de l'évolution des concentrations cellulaires dans les compartiments droit et gauche du double fermenteur et dans le fermenteur simple lors de l'expérience n°4. Moyennes de 2 répétitions. Ecart type max $\pm 2,8 \cdot 10^6$.

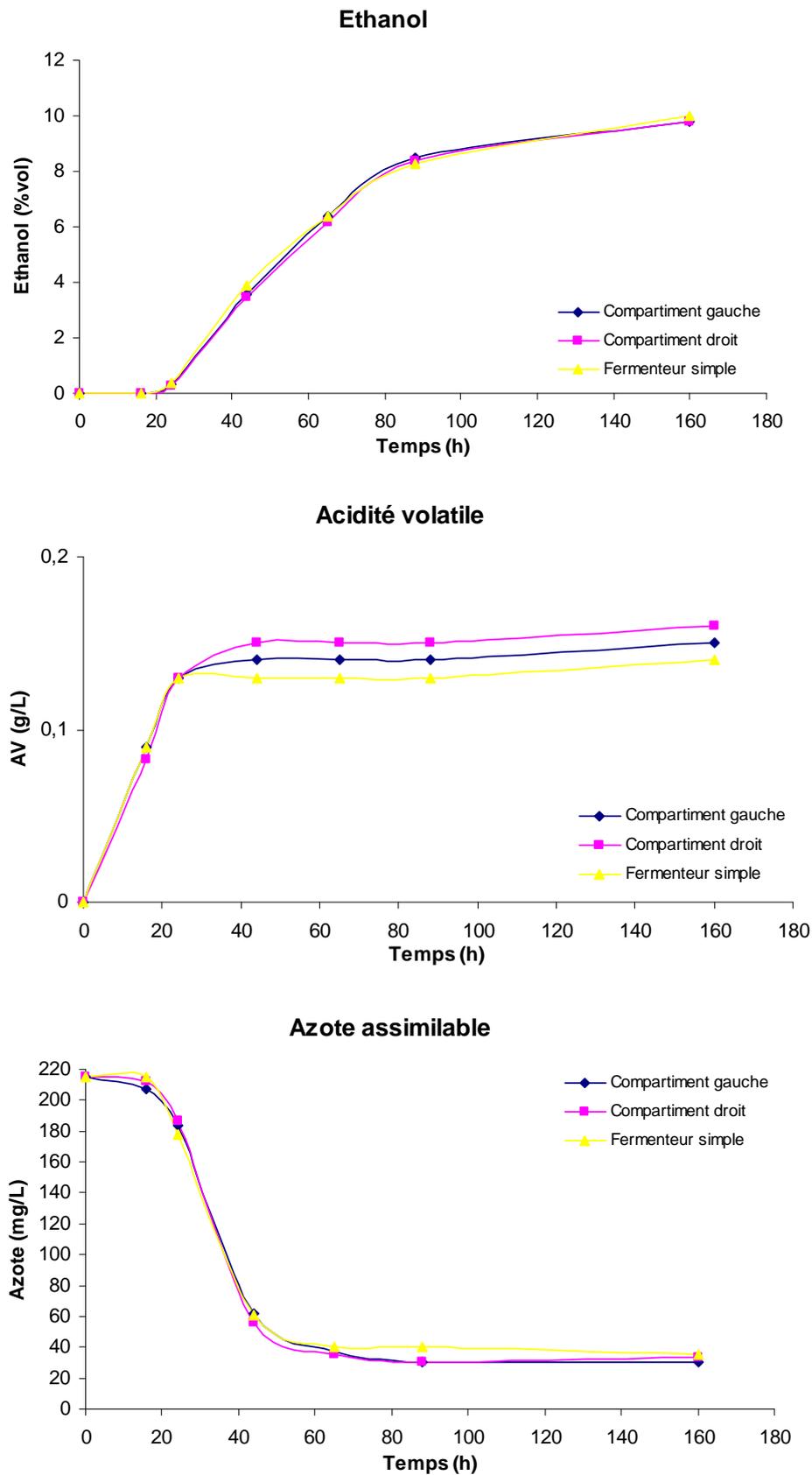


Figure 73 Evolution de la composition du milieu (éthanol, AV et azote assimilable) dans les 2 compartiments du double fermenteur et dans un fermenteur simple lors de l'expérience n°4. Moyennes de 2 répétitions. Ecart type max $\pm 0,2$ pour l'éthanol, $\pm 0,02$ pour l'AV et ± 5 pour l'azote assimilable.

En conclusion, le fermenteur à double compartiment séparé par une membrane centrale et couplé à une pompe péristaltique pilotée par ordinateur répond donc à toutes les contraintes de fonctionnement et donne des résultats répétables dans le temps. Ces résultats sont similaires en terme de concentration cellulaire et de composition du milieu entre les 2 compartiments du double fermenteur et similaires aux résultats obtenus dans les mêmes conditions avec un fermenteur simple. De même, les paramètres cinétiques obtenus à l'aide du fermenteur à double compartiment sont tout à fait comparables à ceux obtenus par l'autre fermenteur. Le fermenteur à double compartiment est donc validé et permet désormais l'étude des interactions entre levures comme initialement souhaité.

5 Application : vérification de l'hypothèse « cell-cell contact »

Selon Nissen *et al.* (2003) et Nissen et Arneborg (2003), la présence en concentrations élevées de *S. cerevisiae* viables entraîne une inhibition de la croissance et une mort précoce de l'espèce *T. delbrueckii* lors de la fermentation alcoolique, dans des conditions proches de l'oenologie. Ces auteurs ont rejeté l'hypothèse d'une inhibition par l'éthanol, par limitation nutritionnelle ou par la production de molécules inhibitrices mais l'ont associé à un phénomène de cell-cell contact entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* dont la croissance n'est alors pas affectée.

A notre connaissance, cette équipe de chercheurs est la seule à avoir émis l'hypothèse d'une inhibition de type cell-cell contact. D'autres auteurs, travaillant sur d'autres couples de souches de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, avec des rapports d'inoculation entre les souches différents, n'ont pas mis en évidence d'inhibition particulière de l'espèce *T. delbrueckii* par *S. cerevisiae* (Bely *et al.*, 2008 ; Ciani *et al.*, 2006). Au contraire, ces auteurs ont mis en avant, que lors de co-inoculation avec des souches de ces 2 espèces, *T. delbrueckii* pouvait même dominer, en terme de population, au début de la fermentation, et limiter ainsi la croissance de la souche *S. cerevisiae*. On peut donc penser que l'inhibition de type cell-cell contact dépend des couples de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* mais aussi du rapport d'inoculation entre les espèces.

Comme déjà décrit précédemment, le fermenteur à double compartiment présente plusieurs intérêts. Il permet notamment de mettre en évidence l'existence d'inhibition de type cell-cell contact entre 2 micro-organismes. Pour cela, il suffit de comparer les croissances des 2 populations qui sont séparées physiquement avec celles obtenues dans un fermenteur simple où les populations sont mélangées. Dans le cas où l'hypothèse d'une inhibition de type cell-

cell contact est écartée, il permet de s'affranchir des méthodes classiques de dénombrement sur milieux gélosés, lourdes à mettre en place. Dans ce cas, il est alors plus facile d'étudier les autres types d'interactions et d'optimiser les protocoles de co-inoculation.

Pour vérifier s'il existe une inhibition de type cell-cell contact entre l'espèce *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, nous n'avons pas privilégié un de nos couples de souches déjà présentés dans ce travail mais le couple de levure qui a permis à Nissen *et al.* (2003) de décrire ce type d'interactions. Pour cela, nous avons gardé au cours de notre expérience, le même rapport d'inoculation de 1/1 entre la souche *T. delbrueckii* CBS et la souche *S. cerevisiae* S101. Cependant, si nous avons maintenu le même rapport d'inoculation, nous avons augmenté les concentrations initiales (10^6 cellules viables/mL au lieu de $5 \cdot 10^4$ cellules/mL). Dans notre protocole, nous avons utilisé notre milieu synthétique MS plus proche de la composition d'un moût que le milieu utilisé par ces auteurs (YPD comprenant 200 g/L de glucose et ajusté à pH 3,2). Par ailleurs, dans leurs conditions expérimentales, ces auteurs ont utilisé un boudin de dialyse pour séparer physiquement les souches. Cette méthode entraîne des décalages dans le temps de la composition du milieu des deux compartiments, décalages qui peuvent représenter un biais dans l'interprétation. Dans nos conditions, grâce à l'utilisation du réacteur à double compartiment où le milieu est homogène dans les 2 compartiments, la comparaison avec le fermenteur simple contenant le mélange des 2 souches sera facilitée. De plus, l'acquisition des vitesses de dégagement dans le temps permettra une comparaison très précise des modalités et complétera les résultats des dénombrements de populations.

Les différentes modalités sont représentées sur la figure 74. Quatre fermenteurs seront comparés à 24°C : 2 fermenteurs contenant les cultures pures (un pour chaque espèce), un fermenteur contenant les 2 espèces en mélange (culture mixte) et un double fermenteur comprenant les 2 espèces séparées physiquement. Nous avons pour le double fermenteur respecté la même concentration cellulaire pour chaque espèce en tenant compte du volume total du fermenteur et non du volume du compartiment où la souche est introduite. Les expériences ont été répétées 3 fois dans le temps mais nous n'avons suivi la croissance uniquement dans 2 des 3 expériences.

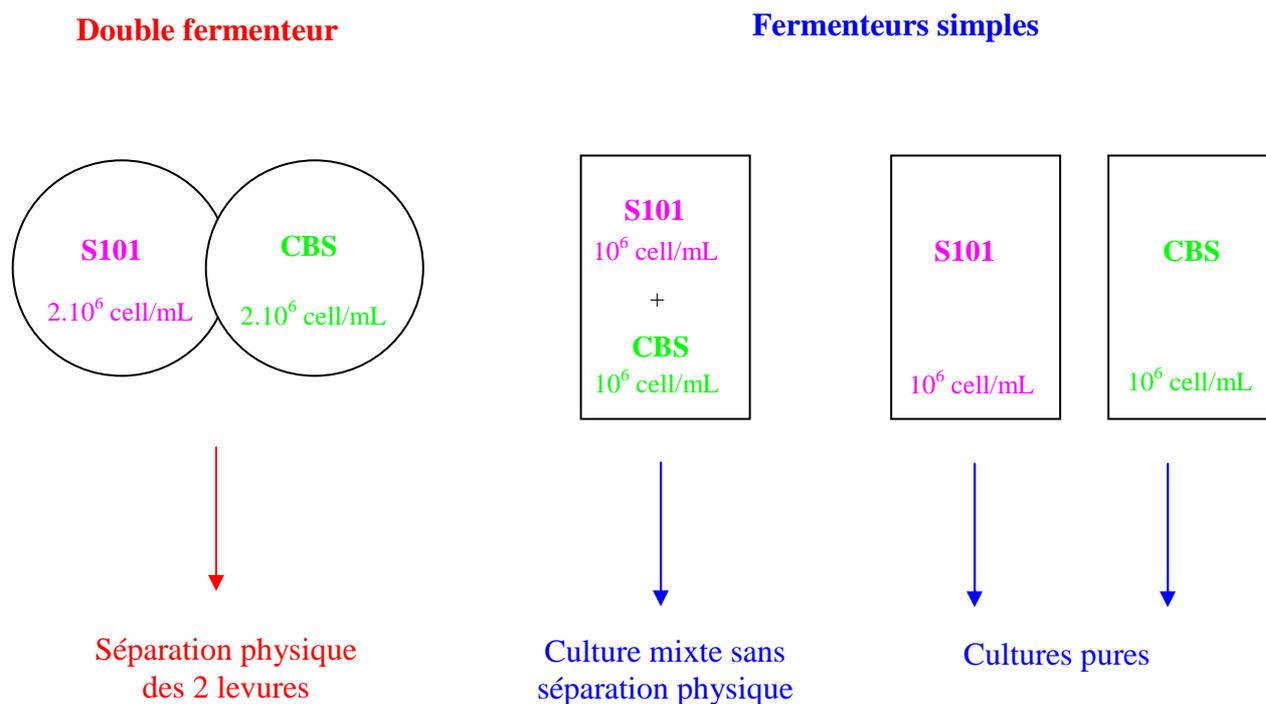


Figure 74 : Présentation des différentes modalités de l'expérience avec les concentrations en cellules viables des 2 souches *T. delbrueckii* CBS et *S. cerevisiae* S101.

5.1 Déroulement de la fermentation et cinétiques fermentaires

Comme le montre le tableau 26, aucune modalité n'a permis la consommation totale des 240 g/L de sucres. Du fait de ces arrêts précoces de fermentation, aucune comparaison des durées de fermentation ne sera faite dans la discussion. Les concentrations moyennes en sucres résiduels varient de 4 g/L (double fermenteur) à 147 g/L (culture pure de *T. delbrueckii*) ce qui correspond à 13,75 et 5,40 %vol. éthanol respectivement. S'il existe une différence significative entre la modalité culture pure *T. delbrueckii* CBS et la modalité double fermenteur, il n'en est pas de même pour les 2 autres modalités. La culture pure de *S. cerevisiae* S101 ainsi que la modalité mixte laissent une concentration en sucres identiques voisine de 26-27 g/L, inférieure à celle de la culture pure CBS et supérieure à la modalité double fermenteur.

Tableau 26 : Ethanol et sucres résiduels en fin de fermentation alcoolique, pour les 4 modalités. Moyenne de 3 répétitions.

	Culture pure S101	Culture mixte S101 + CBS	Double fermenteur S101 / CBS	Culture pure CBS
Ethanol (% vol.)	12,46 ± 0,64	12,37 ± 0,85	13,75 ± 0,25	5,40 ± 1,51
Sucres (g/L)	26,5 ± 10,9	27,9 ± 14,6	4,2 ± 2,2	147,4 ± 27,9

Les vitesses de dégagement de CO₂ en fonction du temps et en fonction du CO₂, obtenues pour les 4 modalités au cours d'une même expérience, sont présentées sur la figure 75. Pour illustrer la répétabilité des expériences, nous avons reporté dans le tableau 27 les valeurs moyennes et les écart-types de 3 paramètres cinétiques : la durée de phase de latence, la vitesse maximale de fermentation (V_{max}) et la vitesse lorsque 45 g/L de CO₂ ont été dégagés (V₄₅), sur un total de 105 g/L potentiels. Nous pouvons observer, d'après ce tableau, que les valeurs de V_{max} et V₄₅ varient peu au cours des 3 répétitions, avec un coefficient de variation maximal de 6,6 et 15% respectivement. Le paramètre, durée de phase de latence, présente cependant des écarts types beaucoup plus importants, et supérieurs à ceux habituellement calculés (10,6%, Chapitre III.3.2, partie Matériels et Méthodes). Ceci peut s'expliquer par le fait que les 2 souches de levures ont rencontré des difficultés à s'adapter à notre milieu synthétique MS, et particulièrement la souche CBS. En effet, pour la modalité en culture pure de cette souche, la durée moyenne de la phase de latence a été supérieure à 5 jours. Dans ces conditions difficiles, il n'est pas étonnant de voir de grandes variations sur ce paramètre cinétique mais dès que la fermentation alcoolique débute il existe moins de variations sur les autres paramètres cinétiques calculés.

Si l'on compare les durées de la phase de latence, il n'y pas de différence significative entre les 3 modalités qui contiennent la souche de *S. cerevisiae*, et ces durées sont bien inférieures à celle de la culture pure de *T. delbrueckii*. On peut remarquer, cependant, que le démarrage dans le double fermenteur a été plus régulier que dans les 2 autres modalités.

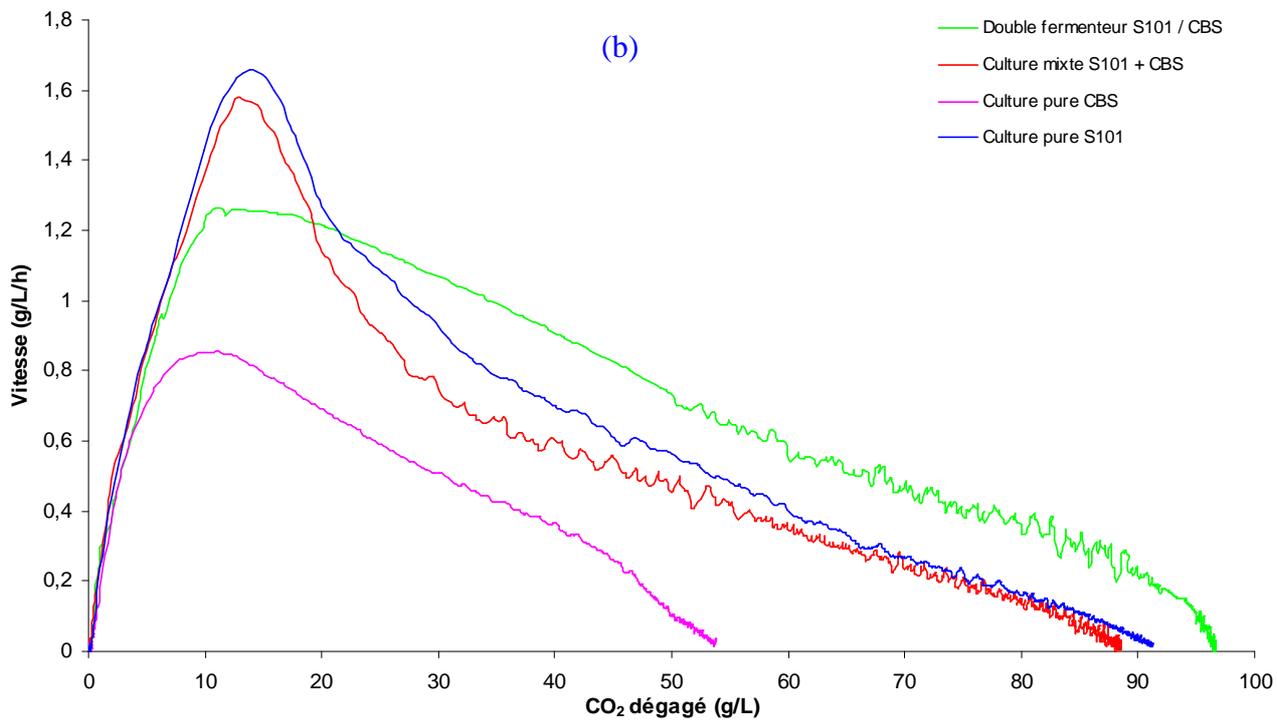
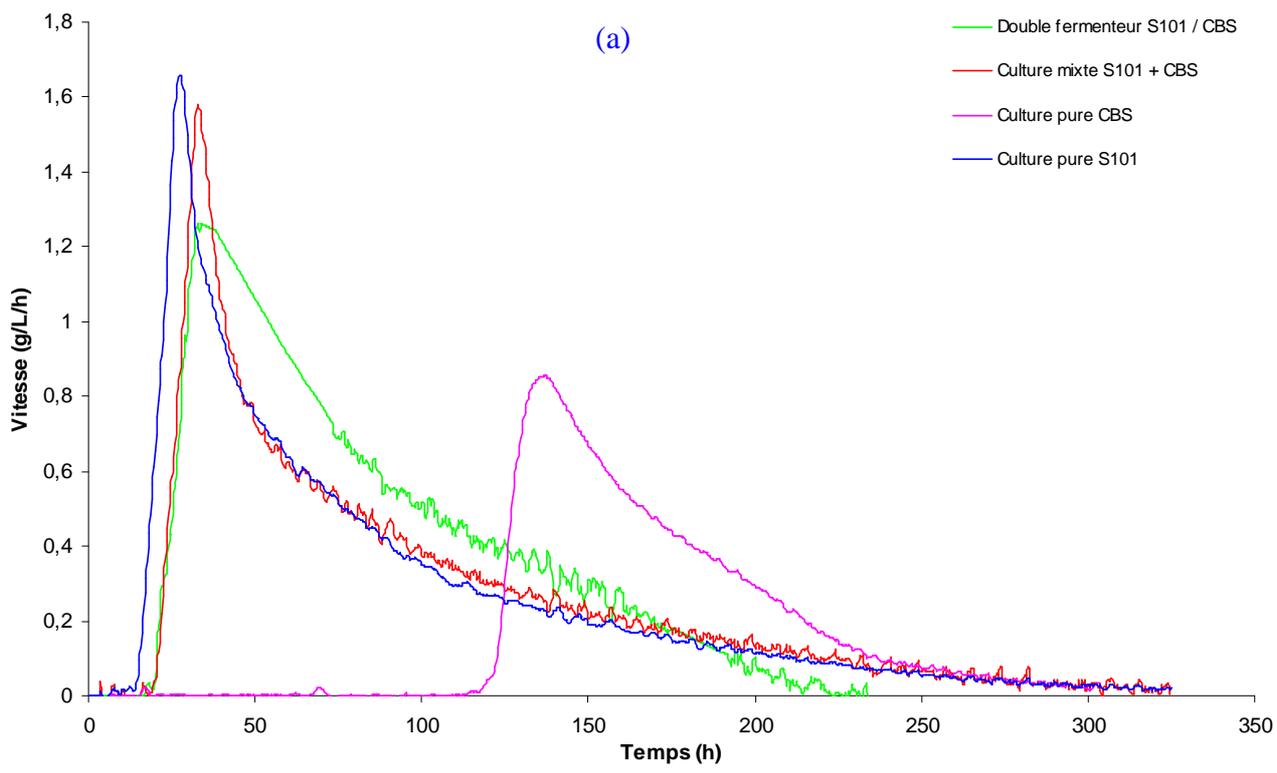


Figure 75 : Vitesses de dégagement de CO₂ des 4 modalités exprimées en fonction du temps (a) et en fonction du dégagement de CO₂ (b).

Tableau 27 : Paramètres cinétiques pour les 4 modalités: durée de la phase de latence, vitesse maximale de dégagement de CO₂ (Vmax.), vitesse de dégagement à 40% de la réaction (V45). Moyenne de 3 répétitions.

	Culture pure S101	Culture mixte S101 + CBS	Double fermenteur S101 / CBS	Culture pure CBS
Phase latence (h)	62 ± 47	46 ± 37	20 ± 1	134 ± 23
V max (g/L/h)	1,72 ± 0,10	1,66 ± 0,11	1,25 ± 0,03	0,84 ± 0,00
V45 (g/L/h)	0,59 ± 0,09	0,58 ± 0,08	0,85 ± 0,02	0,25 ± 0,01

Le Vmax et le V45 de la modalité *T. delbrueckii* pure sont significativement plus faibles que les 3 autres modalités. Ces résultats sont en accord avec nos travaux de caractérisation en fermentation pure sur milieu synthétique MS où nous avons déjà remarqué la plus faible aptitude fermentaire de l'espèce *T. delbrueckii* en comparaison à l'espèce *S. cerevisiae*. La modalité double fermenteur (séparation des 2 levures) présente un Vmax significativement plus faible que celui obtenu pour les modalités *S. cerevisiae* pure (-27%) et mixte (-25%), ainsi qu'un V45 significativement plus élevés (+44% et +46% respectivement).

En conclusion, ces premiers résultats nous permettent de distinguer 3 cinétiques différentes:

- la modalité pure *T. delbrueckii* caractérisée par une durée de phase de latence longue, des vitesses de fermentations faibles (Vmax et V45) et une concentration en sucres résiduels très élevée (147 g/L);
- la modalité *S. cerevisiae* pure et la modalité mixte (levures non séparées) qui sont très similaires avec une phase de latence courte, une vitesse en début de fermentation élevée mais une vitesse à mi-réaction faible qui va entraîner un arrêt précoce de la fermentation à 25-27 g/L ;
- la modalité où les 2 espèces sont séparées, qui démarre rapidement et est caractérisée par un Vmax plus faible que les 2 autres modalités contenant *S. cerevisiae* mais par une chute de vitesse après le Vmax beaucoup moins importante. La consommation en sucres est plus élevée (seulement 4 g/L de sucres résiduels) et donc la production d'éthanol plus importante que pour les autres modalités.

De plus, ils montrent aussi que la séparation physique des 2 souches modifie nettement la cinétique fermentaire par rapport à une culture où elles sont mélangées.

5.2 Populations maximales

Dans la modalité mixte sans séparation des 2 espèces, le dénombrement spécifique de la souche de *T. delbrueckii* CBS et de la souche *S. cerevisiae* S101 a nécessité un gros travail de préparation avant la réalisation de l'expérience. En effet, pour dénombrer chaque espèce, il est nécessaire d'utiliser 2 milieux différents : le milieu classique YPDA qui permet le développement des 2 levures et un milieu spécifique ne permettant la croissance que de la souche de *T. delbrueckii*. La concentration cellulaire de la souche *S. cerevisiae* est alors obtenue par soustraction de la population obtenue sur milieu YPDA par celle obtenue sur milieu sélectif. Le milieu spécifique utilisé par Nissen *et al.* (2003) est un milieu commercial Lysine Agar (Oxoid) qui permet en théorie le développement d'espèces non-*Saccharomyces* mais pas celui de l'espèce *S. cerevisiae*. Or, lors d'expériences préliminaires (non présentées), nous avons mis en évidence que le développement de la souche *S. cerevisiae* S101, utilisée dans cette expérience, était possible sur ce milieu. Aussi, pour dénombrer uniquement la souche *T. delbrueckii*, nous avons utilisé un autre milieu sélectif de même composition que le milieu YPDA mais auquel est ajouté un antibiotique permettant l'inhibition de l'espèce *S. cerevisiae* : l'actidione (cycloheximide). La principale difficulté a été de trouver la dose optimale d'actidione à ajouter pour obtenir un milieu permettant, d'une part, la croissance de la souche *T. delbrueckii* CBS et, d'autre part, l'inhibition de la souche *S. cerevisiae* S101. En effet, la résistance de l'espèce *T. delbrueckii* à cet antibiotique varie énormément d'une souche à l'autre, et cette souche s'est révélée particulièrement sensible. Au final, l'utilisation d'une dose très faible d'actidione de 0,435 µg/mL, introduite dans le milieu YPDA, permet la croissance de la souche de *T. delbrueckii*, mais pas celle de la souche *S. cerevisiae*. La croissance de la souche *T. delbrueckii* sur ce milieu spécifique (YPDA + actidione) donne des résultats similaires à sa croissance sur milieu YPDA non additionné d'actidione mais avec un décalage dans le temps puisque les colonies sont comptables, respectivement, après 96 et 48h. Nous avons aussi vérifié, pour les 2 souches utilisées, qu'il y avait une bonne adéquation entre la concentration cellulaire obtenue par dénombrement sur boîte (levures viables exprimées en UFC/mL) et celle obtenue par le compteur à particules associé au calcul du taux de viabilité par la technique du bleu de méthylène (cellules viables/mL). La différence est faible pour les 2 espèces jusqu'à l'obtention de la population maximale où les viabilités sont élevées (maximum 10% en plus pour le compteur à particules) mais elle est un peu plus importante, notamment pour la souche *T. delbrueckii* CBS lors de la phase de déclin (maximum 15% en plus pour le compteur à particules).

Les concentrations maximales (X_{max}) moyennes sont présentées dans le tableau 28 pour les 4 modalités. La concentration en azote assimilable résiduel est voisine de 10 mgN/L dans toutes les modalités sauf la culture pure *T. delbrueckii* CBS (40 mgN/L).

Tableau 28 : Populations cellulaires maximales (X_{max}) pour les 4 modalités. Moyenne de 2 répétitions.

	Populations maximales (cellules viables/mL)			
	Culture pure S101 ⁽¹⁾	Culture mixte S101 + CBS ⁽²⁾	Double fermenteur S101 / CBS ⁽¹⁾	Culture pure CBS ⁽¹⁾
<i>S. cerevisiae</i> S101	$5,2 \cdot 10^7 \pm 2,5 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^7 \pm 2,2 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^7 \pm 2,9 \cdot 10^6$	/
<i>T. delbrueckii</i> CBS	/	$3,7 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^7 \pm 1,8 \cdot 10^6$

(1) : Dénombrement par compteur à particules + bleu de méthylène

(2) : Dénombrement par étalement sur milieux gélosés

La population maximale obtenue lors de la culture pure *T. delbrueckii* CBS est inférieure à celle obtenue pour la culture pure *S. cerevisiae* S101 puisqu'elles sont respectivement de $3,6 \cdot 10^7$ et $5,2 \cdot 10^7$ cellules viables/mL. Cette moindre performance de la souche CBS peut être en partie attribuée à une plus faible consommation de l'azote assimilable que la souche *S. cerevisiae* S101. Par ailleurs, lorsque cette souche est en présence de la souche *S. cerevisiae* S101, avec ou sans séparation, sa croissance est fortement diminuée et ne dépasse pas les $3,7 \cdot 10^6$ cellules viables/mL, soit environ 10 fois moins. Ce résultat n'est pas surprenant car nous avons déjà constaté, lors de la caractérisation de *T. delbrueckii* sur milieu synthétique MS, que cette espèce présente une phase de latence plus longue et une capacité fermentaire plus faible que l'espèce *S. cerevisiae*. Pour un taux d'inoculation égal, il paraît logique que les meilleures performances de l'espèce *S. cerevisiae* limitent sa croissance. De plus, la souche *T. delbrueckii* CBS ne semble pas très performante, car elle est caractérisée en culture pure, par une durée de phase de latence particulièrement longue, et une capacité biotique peu élevée pour cette espèce (lors de la caractérisation de nos souches sur le même milieu la X_{max} moyenne obtenue était de $1,7 \cdot 10^8$ cellules viables/mL). Dans le cas présent, le rapport d'inoculation 1/1, utilisé pour se rapprocher des conditions de Nissen *et al.* (2003) n'a donc pas favorisé le développement de la souche *T. delbrueckii* CBS, sûrement par limitation nutritionnelle (compétition pour l'azote, vitamines....).

Les populations maximales atteintes, avec la souche *S. cerevisiae* S101, sont similaires dans les 3 modalités où elle est présente, soit environ $5,2 - 5,3 \cdot 10^7$ cellules viables/mL. La présence de la souche *T. delbrueckii* n'a donc pas affecté sa croissance en terme de X_{max} , et elle est donc toujours l'espèce dominante.

5.3 Effet de la séparation physique des 2 espèces

L'évolution des concentrations cellulaires de la souche *S. cerevisiae* S101 en fonction de l'avancement de la réaction dans le double fermenteur et dans le fermenteur simple sans séparation physique des 2 populations est présentée sur la figure 76. L'évolution dans le fermenteur simple est identique à celle obtenue dans la modalité pure S101, non représentée sur le graphe. Si les valeurs de X_{max} sont similaires on peut cependant remarquer qu'elles ne sont pas atteintes au même moment, soit après environ 35 et 45 g/L de CO_2 dégagés (valeurs moyennes des 2 répétitions), pour respectivement la modalité mixte et la modalité où les espèces sont séparées. La croissance de la souche S101 est donc plus lente lorsqu'elle est séparée physiquement de la souche *T. delbrueckii* CBS, ce qui explique la vitesse de fermentation maximale (V_{max}) plus faible (tableau 27). En effet, si l'on regarde les concentrations cellulaires à l'obtention du V_{max} , c'est à dire aux environs de 11 g/L de CO_2 dégagés, l'estimation de la population moyenne de la souche S101 est d'environ de $2,05 \cdot 10^7$ cellules viables/mL dans le double fermenteur alors qu'elle est de $3,4 \cdot 10^7$ UFC/mL dans le fermenteur mixte. Cette différence, d'environ 40%, est supérieure à la variation de 10% que l'on peut obtenir lorsque l'on compare les 2 techniques de dénombrement utilisées (compteur à particules associé à la technique du bleu de méthylène et étalement sur milieux gélosés). Par ailleurs, à ce moment de la réaction, la population de l'espèce *T. delbrueckii* représente dans les 2 cas moins de 8% de la population totale (7,9% pour le fermenteur simple et 4,5% pour le double fermenteur) et affecte donc peu la valeur du V_{max} . Dans le fermenteur double, après l'obtention de la vitesse maximale de dégagement de CO_2 , la croissance de la souche *S. cerevisiae* S101 continue à augmenter pendant environ 34 g/L de CO_2 dégagés (la X_{max} est atteinte vers 45 g/L) alors que dans le cas de la culture mixte, la croissance de cette souche se termine plus rapidement après l'obtention du V_{max} , soit après 21 g/L de CO_2 dégagés (V_{max} et X_{max} obtenus à 14 et 35 g/L de CO_2 dégagés respectivement). La croissance plus lente dans le fermenteur double permet donc un maintien de la vitesse plus proche de sa valeur maximale pendant une période plus longue (figure 75). On peut alors penser que cette croissance qui perdure compense la chute brutale de la vitesse de fermentation que l'on

observe généralement après la V_{max} . Cette chute de vitesse a été attribuée, par divers auteurs, à plusieurs mécanismes dont notamment la perte d'activité des systèmes de transports (Lagunas *et al.* 1982, Salmon *et al.* 1993). Après l'obtention de sa X_{max} , la population viable de *S. cerevisiae* S101 dans le double fermenteur diminue lentement jusqu'à 90 g/L de CO_2 dégagés, alors que l'on observe une phase de déclin plus précoce dans l'autre modalité, ce qui entraîne une concentration en sucres résiduels plus élevée.

L'évolution des concentrations cellulaires de la souche *T. delbrueckii* CBS, en fonction de l'avancement de la réaction dans le double fermenteur et dans la modalité mixte sans séparation, est présentée sur la figure 77. On peut voir que la croissance de la souche de *T. delbrueckii* en début de fermentation est légèrement supérieure dans la modalité mixte que dans le double fermenteur pour les 2 expériences mais ces différences ne sont pas significatives si on tient compte de la variation maximale (10%) que l'on peut obtenir entre les 2 techniques de dénombrement utilisées. Par contre, la séparation physique permet à la souche de *T. delbrueckii* CBS de maintenir plus longtemps sa population viable à des concentrations plus élevées que sans la séparation. En effet, la population de la souche *T. delbrueckii* commence à chuter, à partir de seulement 90 g/L de CO_2 dégagés soit à 11,6 % vol. éthanol dans le double fermenteur alors que la chute de la population viable apparaît entre 35 et 55 g/L de CO_2 dégagés (soit entre 4,5 et 5,8 % vol. éthanol) dans le fermenteur où les 2 populations sont mélangées. On peut noter également que le début de la phase de déclin de l'espèce *T. delbrueckii* CBS, dans la culture mixte, correspond aussi au début de la chute de viabilité de la population de *S. cerevisiae* S101. A la fin de la fermentation alcoolique, dans la modalité où les levures sont séparées, la population cellulaire viable de la souche de *T. delbrueckii* est encore élevée ($1,2 \cdot 10^6$ et $5,1 \cdot 10^5$ cellules viables/mL), alors que, dans l'autre modalité, elles chutent à $7 \cdot 10^4$ et $4 \cdot 10^4$ UFC/mL selon l'expérience. Cependant, en culture séparée, même si la population de *T. delbrueckii* CBS est maintenue à des concentrations non négligeables jusqu'à la fin de la réaction, on peut penser que sa participation à la dégradation des sucres est limitée car elle représente uniquement 3,8% de la population totale durant la phase stationnaire de croissance.

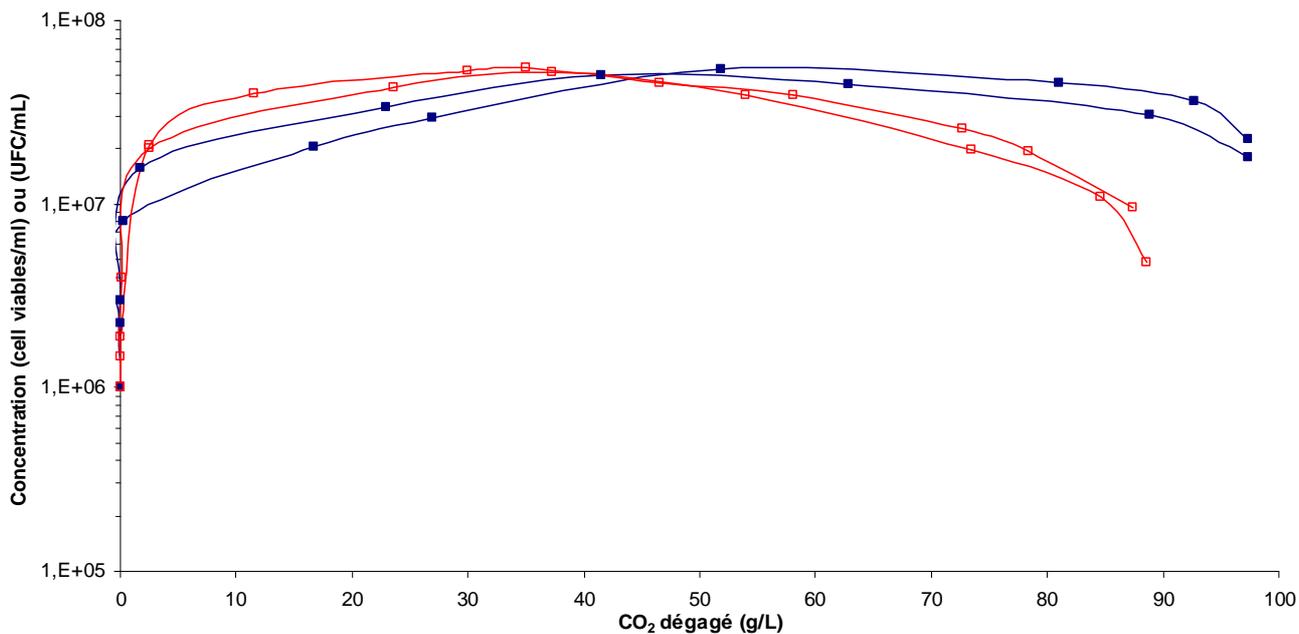


Figure 76 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire de la souche *S. cerevisiae* S101 en fonction du dégagement de CO₂ dans le double fermenteur (symbole plein) et dans le fermenteur simple sans séparation (symbole vide). Représentation de 2 répétitions. Population en cellules/mL pour le fermenteur double et en UFC/mL pour le fermenteur simple.

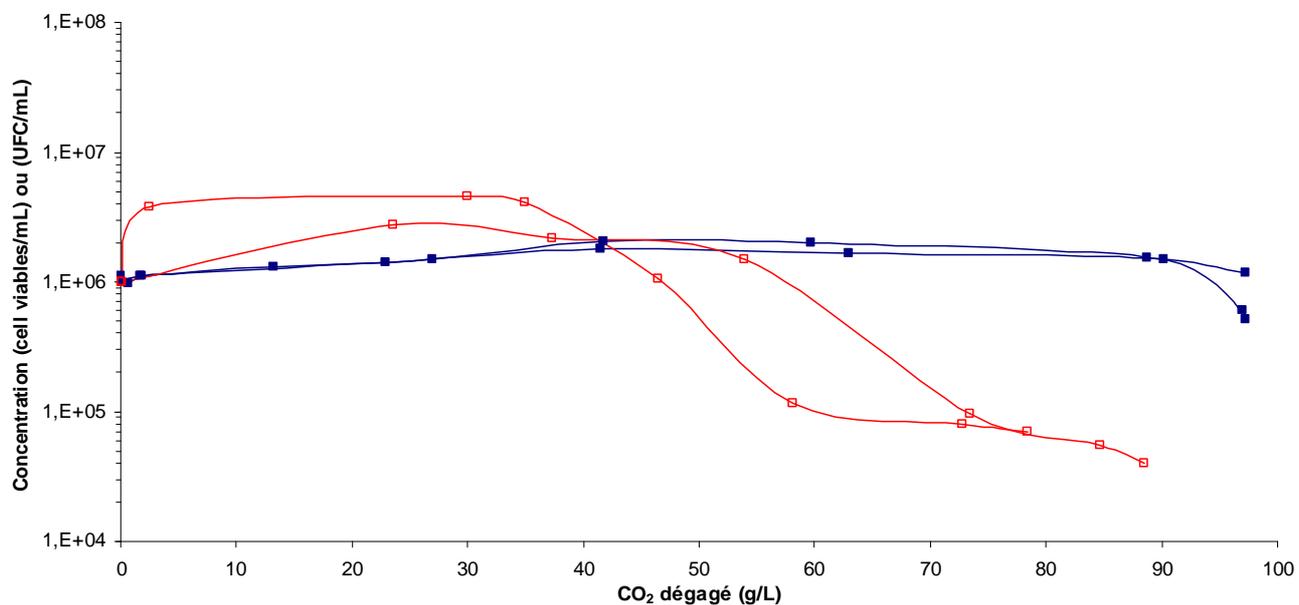


Figure 77 : Représentation logarithmique de l'évolution de la concentration cellulaire de la souche *T. delbrueckii* CBS en fonction du dégagement de CO₂ dans le double fermenteur (symbole plein) et dans le fermenteur mixte sans séparation (symbole vide). Représentation de 2 répétitions. Population en UFC/mL pour le fermenteur double et cellules/mL pour le fermenteur simple

Aussi, on peut conclure que l'espèce *S. cerevisiae* est toujours l'espèce dominante dans la culture mixte et dans la culture où les populations sont séparées. Ce résultat est cohérent car le rapport d'inoculation choisi de 1/1 entre les 2 populations n'est pas favorable pour l'espèce *T. delbrueckii*. En effet, elle se retrouve pénalisée à la fois par son temps d'adaptation plus long et sa croissance plus faible ce qui entraîne un retard dans la consommation des nutriments essentiels du milieu par rapport à l'autre espèce (compétition azote, vitamines...). Dans ces 2 cultures, la viabilité de *T. delbrueckii* CBS n'est pas affectée en début de réaction, par contre, sa séparation physique de la souche *S. cerevisiae*, a permis d'observer un recul très marqué de sa phase de déclin. Dans la culture mixte, la mortalité débute vers 5 % vol. éthanol, alors qu'elle ne débute qu'en fin de fermentation alcoolique autour de 11,6 % vol. éthanol dans le double fermenteur. Dans les 2 cas, la concentration en cellules de *S. cerevisiae* S101 est élevée, c'est-à-dire proche de sa valeur maximale. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Nissen *et al.* (2003) et Nissen et Arneborg (2003) à savoir que l'on peut exclure une inhibition de la souche *T. delbrueckii* CBS par l'éthanol et qu'il existe bien un mécanisme du type « cell-cell contact » qui est à l'origine de l'inhibition de cette dernière par la souche *S. cerevisiae* S101 présente en concentrations élevées. Cependant, contrairement à ces travaux, où la croissance de la souche *S. cerevisiae* S101 n'est pas affectée par la séparation, nous observons ici un effet bénéfique de cette situation. En effet, si la séparation physique des 2 espèces a diminué le taux de croissance de S101, sans en modifier la concentration cellulaire maximale atteinte, elle a surtout permis de retarder sa phase de déclin. Cette évolution, différente de celles observées dans le fermenteur mixte mais également dans la modalité pure S101 (non présentée), explique la meilleure performance fermentaire de la culture du fermenteur double que nous avons mis en évidence plus haut, c'est-à-dire une meilleure production d'éthanol en fin de réaction. Lors de la séparation, on peut donc penser qu'il y a une interaction positive indirecte entre les 2 espèces, à travers des changements physicochimiques de l'environnement provoqués par une des 2 souches, voir les deux. Il est impossible, ici, de décrire ces changements, car d'autres expériences sont nécessaires. Dans cette situation où les espèces sont séparées, la production de certaines molécules ayant des pouvoirs inhibiteurs plus ou moins forts est peut-être réduite : acides gras à courte et moyenne chaîne, comme les acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque, molécules « killer », des enzymes, des protéines, des glycoprotéines, de l'acide acétique, de l'acétoïne... Au contraire, la production de molécules activatrices est peut-être favorisée : certains acides gras à longue chaîne en C18 (acide oléique avec une double liaison et acide linoléique avec deux doubles liaisons... Des actions synergiques entre ces composés pourraient aussi jouer un rôle

important dans les mécanismes d'interaction. Certaines molécules, comme l'acétaldéhyde, peuvent également jouer un rôle essentiel. Récemment Cheraiti *et al.* (2005) ont montré qu'il existait des échanges de cette molécule en co-inoculation, entre *S. cerevisiae* et *S. uvarum* durant la fermentation alcoolique en conditions œnologiques. Cet accepteur d'électron peut aussi moduler la production d'autres composés impliqués dans la maintenance de l'équilibre d'oxydo-réduction tels que l'acide succinique, l'acide acétique, et l'acetoïne (Roustan et Sablayrolles, 2002a). Roustan et Sablayrolles (2002b) ont également montré qu'une addition de ce composé à une culture pure de *S. cerevisiae*, pouvait modifier sa cinétique et sa croissance et que la réponse de la levure était activée ou inhibée selon le mode d'injection (fractionné ou continu). Cheirati *et al.* (2008) complètent ces travaux en précisant qu'une addition d'acétaldéhyde au cours de la croissance modifie la consommation du Zinc ce qui peut moduler la croissance de la levure.

Synthèse générale et Perspectives

L'objectif majeur de ces travaux de thèse était la caractérisation de l'espèce *Torulaspora delbrueckii* en conditions œnologiques, puis la mise au point d'un protocole de co-inoculation avec l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* dans le but de réduire la production d'acidité volatile des vins liquoreux. Cette thèse, financée par la société Laffort, présentait également un objectif plus industriel qui était la sélection d'une souche de levure *T. delbrueckii* pour l'élaboration des vins liquoreux mais également des vins secs blancs et rosés. Enfin, le dernier objectif de ces travaux de thèse était la mise au point d'un outil permettant l'étude des interactions entre levures, notamment entre les espèces *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae*, au cours de la fermentation alcoolique.

Dans un premier temps, afin de pouvoir différencier les souches de *T. delbrueckii* entre elles, nous avons évalué différentes méthodes de biologie moléculaire déjà utilisées au laboratoire pour la caractérisation génétique des souches de diverses espèces de levures non-*Saccharomyces*. Au final, la méthode de REA (Restriction Endonuclease Analysis) de l'ADN génomique, suivie d'une électrophorèse en champ pulsé (PFGE), s'est révélée efficace et a permis la différenciation de 90% des souches testées.

La seconde étape de ces travaux de thèse a été la caractérisation d'un point de vue phénotypique de l'espèce *T. delbrueckii*, en conditions œnologiques, à partir d'une collection de 30 souches de levures. Les tests spécifiques utilisés nous ont permis de mettre en évidence que *T. delbrueckii* ne produit pas de toxine « killer » K2 et qu'elle est insensible à cette toxine. Elle produit peu de sulfure d'hydrogène et présente une très faible production de phénols volatils. Enfin, elle est caractérisée par une variabilité phénotypique importante au niveau de sa croissance, qui est meilleure à 26°C qu'à 10°C et quasi nulle à 37°C.

Les aptitudes fermentaires de l'espèce *T. delbrueckii* ont été évaluées sur milieu synthétique, mimant la composition d'un moût de raisin blanc. Ces expériences ont permis, hormis pour le rendement éthanol/sucres qui est similaire pour toutes les souches et identique à celui de l'espèce *S. cerevisiae*, de mettre en évidence une grande variabilité phénotypique au sein de cette espèce. En effet, la production d'éthanol varie de 6,3 à 10,9 % vol. à 24°C. Certaines souches sont donc particulièrement performantes, pour des levures non-*Saccharomyces*, mais aucune d'entre elles n'a été capable d'achever la fermentation alcoolique, contrairement aux souches de *S. cerevisiae* testées dans les mêmes conditions. Les cinétiques fermentaires sont

également très différentes selon les souches. En effet, certaines souches sont caractérisées par des durées de phase de latence relativement courtes, c'est-à-dire très proches de celles de *S. cerevisiae*, alors que d'autres présentent des durées de phase de latence relativement longues. Ce paramètre est très important en vue d'une sélection car il reflète le temps nécessaire à la levure pour s'adapter au moût. Si celui-ci est court, la souche a plus de chance de s'implanter dans le milieu de fermentation où règne une compétition importante entre les levures. Malgré les performances intéressantes de certaines souches, les vitesses de fermentations de l'espèce *T. delbrueckii* sont plus faibles que celles de l'espèce *S. cerevisiae*. Par ailleurs, nos travaux ont montré que les levures *T. delbrueckii* étaient plus petites en taille et en volume cellulaire qu'une levure *S. cerevisiae*. A l'échelle de la population, bien que le nombre de levures de l'espèce *T. delbrueckii* soit en moyenne supérieur à celui de l'espèce *S. cerevisiae* (meilleure capacité biotique), le volume cellulaire moyen de sa population est inférieur à celui de l'espèce *S. cerevisiae*, ce qui pourrait être une explication des moins bonnes performances fermentaires de cette espèce. En outre, *T. delbrueckii* ne présente pas de consommation particulière du fructose.

Par ailleurs, certaines souches de *T. delbrueckii* sont résistantes aux concentrations élevées en SO_2 car elles sont capables de réaliser la fermentation alcoolique dans un milieu avec 3,6 g/hL de SO_2 libre, correspondant à une dose de 7,5 g/hL de SO_2 total. L'augmentation de la concentration en SO_2 allonge cependant la durée de phase de latence, mais ce phénomène se retrouve également pour l'espèce *S. cerevisiae*. L'effet du pH initial du milieu sur les durées de phase de latence est variable selon les souches de l'espèce *T. delbrueckii*. Ce comportement est différent de celui de l'espèce *S. cerevisiae* où les durées de phases de latence ne sont pas influencées par le pH.

L'évaluation de divers composés aromatiques, lors de la fermentation alcoolique sur milieu synthétique, n'a pas permis de mettre en évidence de molécule odorante produite en grande quantité et pouvant caractériser l'espèce *T. delbrueckii*. Seul le phényl-2-éthanol semble être produit à des concentrations supérieures à son seuil de perception. Cet essai a cependant permis d'illustrer la pureté de fermentation de l'espèce *T. delbrueckii* caractérisée par une très faible production de composés à défauts aromatiques comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde et le diacétyl.

Par ailleurs, l'espèce *T. delbrueckii* est également caractérisée par une plus faible production d'acidité volatile (AV) et de glycérol que l'espèce *S. cerevisiae*, notamment pour les milieux très riches en sucres. Ces faibles productions sont dues à la fois à des faibles rendements AV et glycérol par milligramme de matière sèche, des faibles biomasses totales (poids sec de la

population de levures) et enfin à un comportement différent de *S. cerevisiae* lors d'un choc osmotique. En effet, lors des premières heures qui suivent un choc osmotique (introduction des levures dans un milieu synthétique à 350 g/L de sucres), il y a chez *S. cerevisiae* une accumulation du glycérol interne par blocage du transport du glycérol vers l'extérieur de la cellule pour contrebalancer la pression osmotique, ce qui provoque une augmentation rapide de l'AV dans le milieu de fermentation. Ce blocage ne semble pas exister chez l'espèce *T. delbrueckii*.

Afin d'exploiter au mieux le métabolisme spécifique de l'espèce *T. delbrueckii*, c'est-à-dire sa faible production d'AV, nous avons réalisé des co-inoculations avec l'espèce *S. cerevisiae* sur moûts liquoreux. Nos travaux ont montré que le rapport d'inoculation initial entre les espèces, ainsi que la concentration en azote initial, sont des paramètres primordiaux, car ils influencent les durées de fermentation. De plus, la concentration en azote initial joue également un rôle important dans la production d'acidité volatile. Dans ces conditions, le rapport d'inoculation avec 10 fois plus de *T. delbrueckii* que de *S. cerevisiae* (10/1) et une concentration en azote assimilable initiale ajustée aux alentours de 200 mgN/L, ont permis, dans tous les essais, une réduction de l'AV importante avec des durées de fermentation proches de la modalité *S. cerevisiae* pure. Par ailleurs, quelle que soit la souche de *T. delbrueckii* utilisée en co-inoculation avec la souche *S. cerevisiae* ST, il y a toujours réduction de la production d'AV, de 23 à 59%, selon les essais et la souche, par rapport à la modalité *S. cerevisiae* pure. Pour finir, nos 2 essais réalisés en chai avec la souche OXT1 1//2 ont permis de réduire la concentration en AV et d'obtenir des vins qui ont été perçus à la dégustation comme significativement différents de la modalité *S. cerevisiae* pure, grâce notamment à un nez plus fruité et un volume en bouche plus important.

L'utilisation potentielle de l'espèce *T. delbrueckii* lors de l'élaboration de vins secs, blancs et rosés, a été également étudiée dans ce travail. La co-inoculation *T. delbrueckii* OXT1 1//2 / *S. cerevisiae* X5 a permis de complexifier la composition aromatique d'un moût blanc sec issu du cépage Sauvignon blanc et d'un moût rosé de cépage Merlot tout en ayant des cinétiques fermentaires très proches de la fermentation réalisée uniquement avec la souche *S. cerevisiae* X5. Sur Sauvignon blanc, la co-inoculation a permis d'augmenter la production d'esters fermentaires de 25%, de phényl-2-éthanol de 51% et de thiols volatils de 31%. Dans les mêmes conditions, sur moût rosé de cépage Merlot, la production totale d'esters n'a pas été augmentée, contrairement à la production de phényl-2-éthanol augmentée de 36%.

Nos travaux sur la caractérisation de l'espèce *T. delbrueckii* sur milieu synthétique, ainsi que ceux en co-inoculations sur moût liquoreux, blancs secs et rosés, nous ont permis de sélectionner la souche, OXT1 1//2. Elle est aujourd'hui commercialisée par la société LAFFORT sous le nom de Zymaflore® Alpha^{TD N.SACCH.}.

La mise au point d'un outil, permettant l'étude des interactions entre levures, a également été réalisée au cours de cette thèse. Cet outil se présente sous la forme d'un fermenteur à 2 compartiments séparés par une membrane centrale. Il permet une séparation physique des levures, tout en conservant l'homogénéité du milieu, entre les 2 compartiments, par l'intervention d'une pompe péristaltique. Son intégration dans notre installation automatisée avec suivi régulier du poids du fermenteur, permet aussi de suivre finement les cinétiques de fermentation. Le fermenteur à double compartiment a été validé en comparant les évolutions de la croissance et du dégagement de CO₂ dans ce fermenteur à celles obtenues dans un fermenteur simple, couramment utilisé au laboratoire. Ce nouvel outil a permis de confirmer l'existence d'un phénomène de type « cell-cell contact » entre les souches *T. delbrueckii* CBS et *S. cerevisiae* S101, comme déjà décrit par Nissen *et al.* (2003) et Nissen et Arneborg (2003). Cependant, contrairement à ces travaux, la séparation physique, dans nos conditions expérimentales, n'a pas seulement eu un effet bénéfique pour la souche *T. delbrueckii* CBS mais également pour la souche *S. cerevisiae* S101. En effet, les 2 souches, lorsqu'elles sont séparées physiquement, meurent plus tardivement (phases de déclin retardées). Des expériences complémentaires sont cependant nécessaires pour essayer d'expliquer en quoi la séparation physique a été bénéfique pour les 2 espèces.

Ces travaux de thèse ouvrent de nombreuses perspectives. En effet, malgré le nombre conséquent de tests phénotypes et fermentaires réalisés, il serait intéressant de les compléter. En effet, nous n'avons pas évalué les besoins en azote de l'espèce *T. delbrueckii* ou encore son comportement vis-à-vis de l'oxygène, deux paramètres importants qui agissent sur la croissance et la viabilité cellulaire.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence des différences entre l'espèce *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* au niveau de leurs mécanismes de réponse au stress osmotique, à partir de l'étude de la production d'AV et de glycérol. Cependant, d'autres molécules comme l'arabitol ou le tréhalose peuvent être impliquées dans la réponse au stress osmotique. L'évaluation de leurs productions, au cours d'un choc osmotique, pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes de réponse au stress osmotique de l'espèce *T. delbrueckii*.

La mise au point du fermenteur à double compartiment a été particulièrement longue et n'a permis d'étudier qu'un seul couple de levures *T. delbrueckii* CBS / *S. cerevisiae* S101. La réalisation de nouvelles expériences, avec d'autres souches de levures, devrait nous permettre de vérifier si le phénomène d'inhibition de type « cell-cell contact », que nous avons observé, est spécifique aux 2 souches étudiées, ou s'il existe systématiquement entre ces 2 espèces. De plus, ces travaux nous permettront de progresser dans la compréhension des mécanismes d'interaction entre les levures.

Enfin, les propriétés aromatiques de l'espèce *T. delbrueckii* ont été peu abordées au cours de ces travaux de thèse. Il serait donc intéressant de trouver des marqueurs spécifiques à cette espèce, permettant d'expliquer les différences perçues à la dégustation, notamment sur le volume en bouche des vins. La mise en évidence de marqueurs spécifiques et l'utilisation du fermenteur à double compartiment devraient permettre l'optimisation des protocoles de co-inoculation et la sélection de couples de levures *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* encore plus performants.

Références Bibliographiques

- Albasi, C., Tataridis, P., Manjarrez, E.S., Taillandier, P., 2001. A new tool for the quantification of microorganism interaction dynamics. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40, 5222-5227.
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Girio, F., 2010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86 (3), 965-972.
- Almeida, M.J., Pais, C., 1996a. Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4401-4404.
- Almeida, M.J., Pais, C.S., 1996b. Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Letters in Applied Microbiology* 23, 154-158.
- Alves-Araújo, C., Hernandez-Lopez, M.J., Prieto, J.A., Randez-Gil, F., Sousa, M.J., 2005. Isolation and characterization of the LGT1 gene encoding a low-affinity glucose transporter from *Torulaspora delbrueckii*. *Yeast* 22, 165-175.
- Alves-Araujo, C., Pacheco, A., Almeida, M.J., Spencer-Martins, I., Leao, C., Sousa, M.J., 2007. Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Microbiology* 153, 898-904.
- Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M.R., 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 1-8.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L., 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* 16, 2179-2187.
- Antunovics, Z., Irinyi, L., Sipiczki, M., 2005. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *Journal of Applied Microbiology* 98, 971-979.
- Arneborg, N., Siegumfeldt, H., Andersen, G.H., Nissen, P., Daria, V.R., Rodrigo, P.J., Gluckstad, J., 2005. Interactive optical trapping shows that confinement is a determinant of growth in a mixed yeast culture. *FEMS Microbiology Letters* 245, 155-159.
- Attfield, P.V., Kletsas, S., 2000. Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. *Letters in Applied Microbiology* 31, 323-327.
- Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L., 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 102, 49-56.
- Baleiras Couto, M.M., Eijnsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H., van der Vossen, J.M., 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and environmental microbiology* 62, 41-46.

- Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1182-1191.
- Barbe, J.C., 2000. La combinaison du dioxyde de soufre dans les moûts et vins issus de raisins botrytisés. Rôle des bactéries acétiques. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 2.
- Barbe, J.C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A., 2000. Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3413-3419.
- Barnett, J.A., 1992. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees : a short review for non-taxonomists. *Yeast*, 8, 1-23.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Barre P., 1992. Le facteur killer, in *Les acquisitions récentes de la microbiologie du vin*, p 63, Tec et Doc, Lavoisier, Paris.
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.M., Salmon, J.M., Barre, P., 1996. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 145-150.
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency : how to survive the making of wine : a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 27-51.
- Belloch, C., Querol, A., Garcia, M.D., Barrio, E., 2000. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 405-416.
- Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2005. Influence of physiological state of inoculum on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 39, 191-197.
- Bely, M., Rinaldi, A., Dubourdieu, D., 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 507-512.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990a. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70, 246-252.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1990b. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319-324.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarede, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312-320.

- Berthels, N.J., Otero, R.R.C., Bauer, F.F., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research* 4, 683-689.
- Bertrand, A., Marly-Brugerolle, C., Sarre, C., 1978. Influence du débouillage des moûts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et eaux-de-vie. *Conn. Vigne Vin*, 12, 35-48.
- Bisson, L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 107-119.
- Bisson, L.F., Block, D.E., 2002. Ethanol tolerance in *Saccharomyces*. In : Ciani, M. (Ed), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeast*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 85-98.
- Blomberg, A., 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiology Letters* 182, 1-8.
- Blomberg, A., Adler, L., 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 171, 1087-1092.
- Blomberg, A., Adler, L., 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in microbial physiology* 33, 145-212.
- Blondin B., Dequin S., Saint-Prix F., Sablayrolles J.M., 2002. La formation des acides volatils par les levures, *in* 13^{ème} Symposium international d'œnologie.
- Cabrera, M.J., Moreno, J., Ortega, J.M., Medina, M., 1988. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 283-287.
- Camarasa, C., Grivet, J.-P., Dequin, S., 2003. Investigation by 13C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* 149, 2669-2678.
- Castelli, T., 1954. Les Agents de la fermentation vinaire. *Archives of Microbiology* 20, 323-342.
- Ceccato-Antonini, S.R., Cremonini, L.C.M., Regenfuss, C., 1999. Killer character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. *Scientia Agricola* 56, 631-635.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., Tood, B.E.N., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* yine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 3, 2-8.
- Charpentier, C., Feuillat, M., 1993. Yeast autolysis. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 225– 242.

- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., Lavigne, V., 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62, 191-202.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera spp.* yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 463-468.
- Cheraiti, N., Guezenec, S., Salmon, J.M., 2005. Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Applied and environmental microbiology* 71, 255-260.
- Cheraiti, N., Sauvage, F.-X., Salmon, J.-M., 2008. Acetaldehyde addition throughout the growth phase alleviates the phenotypic effect of zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 1093-1109.
- Ciani, M., 1995. Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 631–634.
- Ciani, M., 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Devel. In Microbiology*, 1, 317-331.
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 239-245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123-133.
- Ciani, M., Fatichenti, F., 1999. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Letters in Applied Microbiology* 28, 203-206.
- Ciani, M., Ferraro, L., 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology* 85, 247-254.
- Ciani, M., Ferraro, L., Fatichenti, F., 2000. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 698-703.
- Ciani, M., Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 199-203.

- Ciani, M., Picciotti, G., 1995. The growth-kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters* 17, 1247-1250.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martinez-Rodriguez, S., Las Heras-Vazquez, F.J., Rodriguez-Vico, F., 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 98, 301-308.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189, 81-87.
- Comitini, F., De Ingeniis, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 238, 235-240.
- Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J.M., 1998. Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 41, 169-175.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.N., Dubourdieu, D., 1995. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal* 10, 385-392.
- Davenport, R.R., 1974. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* 13, 123-130.
- Delfini C., Gracia-Moruno E., Pagliara A., Contiero M., 1989. Technological and biological factors causing the production of large amounts of acetic acid by wine yeasts during alcoholic fermentation. Symposium on Yeasts ISSY XIII, Leeuven.
- Delfini C., Cervetti F., 1987. Esistenza nei mosti d'uva di un fattore che regola la produzione di acido acetico da parte dei lieviti nel corso della fermentazione alcolica. *Vigne Vini*, 12, 55-60.
- De Revel, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 1989. Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*. Réduction du diacétyle. *Connaiss. Vigne Vin*. 23 (1), 39-45.
- Di Maro, E., Ercolini, D., Coppola, S., 2007. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology* 117, 201-210.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology* 20, 377-384.
- Dizy, M., Bisson, L.F., 2000. Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 155-167.
- Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C., Sabatelli, M.P., 2007. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic

characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology* 115, 281-289.

Dubois, E., Grenson, M., 1979. Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Molecular and General Genetics*, 175, 67-76.

Du Toit, M., Pretorius, I.S. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine : using weapons from nature's own arsenal : a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 74-96.

Dukes, B.C., Butzke, C.E., 1998. Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 125-134.

Edwards, C.G., Beelman, R.B., Bartley, C.E., McConnell, A.L., 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 48-56.

Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology* 85, 779-789.

Erasmus, D.J., Cliff, M., van Vuuren, H.J.J., 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *American Journal of Enology and Viticulture* 55, 371-378.

Erasmus, D.J., van der Merwe, G.K., van Vuuren, H.J.J., 2003. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research* 3, 375-399.

Erten, H., 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18, 373-378.

Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., Ferreira, V., 2007. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4501-4510.

Etievant, P.X. 1991. Volatile compounds in foods and beverages. Marcel Dekker ed. Marcel Dekker.

Fernandez, M., Ubeda, J.F., Briones, A.I., 2000. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology* 59, 29-36.

Fernandez, M.T., Ubeda, J.F., Briones, A.I., 1999. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiology Letters* 173, 223-229.

Ferraro, L., Fatichenti, F., Ciani, M., 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* 35, 1125-1129.

Ferreira, V., López, R., Cacho, J.F., 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1659-1667.

Fia, G., Giovani, G., Rosi, I., 2005. Study of beta-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology* 99, 509-517.

Fiechter, A., Seghezzi, W., 1992. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology* 27, 27-45.

Fleet, G.H., 1992. Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 1-44.

Fleet, G.H., Heard, G.M. 1993. Yeast - Growth during Fermentation. In: Fleet, G., (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood academic publishers, Chur. 27-54.

Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22.

Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8, 979-995.

Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and environmental microbiology* 48, 1034-1038.

Franc, C., David, F., de Revel, G., 2009. Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 3318-3327.

Frezier, V., Dubourdieu, D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 375-380.

Fugelsang, K.C. 1997. *Wine Microbiology*. Chapman and Hall, NewYork., p 92-93.

Furukawa, Y., Kimura, S., 1971. Effect of pantothenic acid deficiency on lipid metabolism in the yeast. *J Vitaminol* 17, 219-224.

Gafner, J., Schütz, M., 1996. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experience to restart stuck fermentations. *Vitic Enol Scien.* 51: 214 - 218.

Ganga, M.A., Martinez, C., 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 96, 76-83.

Gao, C.X., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 405-409.

- Garcia, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., Gunata, Z., 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *Journal of Food Science* 67, 1138-1143.
- Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *International Journal of Food Microbiology* 125, 141-145.
- Gil, J.V., Mateo, J.J., Jimenez, M., Pastor, A., Huerta, T., 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *Journal of Food Science* 61, 1247-1254.
- Gillies, R.J., Deamer, D.W., 1979. Intracellular pH changes during the cell cycle in Tetrahymena. *Journal of Cellular Physiology* 100, 23-31.
- Gonzalez-Pombo, P., Perez, G., Carrau, F., Guisan, J.M., Batista-Viera, F., Brena, B.M., 2008. One-step purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol Lett* 30, 1469-1475.
- Gonzalez, S.S., Barrio, E., Querol, A., 2007. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology* 102, 1018-1025.
- Gonzalez, B., François, J., Renaud, M., 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13, 1347-1355.
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini, M., 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology* 87, 949-956.
- Grout, B., Morris, J., McLellan, M., 1990. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends in Biotechnology* 8, 293-297.
- Guilloux-Benatier, M., Chassagne, D., Alexandre, H., Charpentier, C., Feuillat, M., 2001. Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of *Brettanomyces/Dekkera* in wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 35, 157-164.
- Gutierrez, A.R., Epifanio, S., Garijo, P., Lopez, R., Santamaria, P., 2001. Killer yeasts: incidence in the ecology of spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 352-356.
- Hansen, E.H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 541-547.
- Hayashi, M., Ohkuni, K., Yamashita, I., 1998. An extracellular meiosis-promoting factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 617-622.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and environmental microbiology* 50, 727-728.

- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1986. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technology in Australia* 38, 22-25.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1987. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2171-2174.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effect of sulphur dioxide on yeast growth during natural and inoculated wine fermentation. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 3, 57-60.
- Henick, K., Edinger, Daniel, Monk. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology* 84, 865-876.
- Henschke P.A., Jiranek V., 1992, *in Wine Microbiology and Biotechnology*, G.H. Fleet, Editeur, Harwood Academic Publishers, Chur, Suisse.
- Henschke P.A., Rose, A.H., 1991. Plasma membrane, in *The Yeasts*, vol. 4, Yeasts organelles, Academic Press, Londres, p. 297.
- Hernandez-Lopez, M.J., Blasco, A., Prieto, J.A., Randez-Gil, F., 2003. Ura- host strains for genetic manipulation and heterologous expression of *Torulaspora delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology* 86, 79-86.
- Hernandez-Lopez, M.J., Prieto, J.A., Randez-Gil, F., 2007. Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84, 125-134.
- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V., 2008. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry* 107, 1064-1077.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., Cabezudo, M.D., 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 313-318.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M., 2006a. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and environmental microbiology* 72, 7148-7155.
- Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M., 2006b. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research* 6, 102-111.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., Takano, H., 1990. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1386-1391.
- Hohmann, S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300-372.

Hounsa, C.-G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S., Prior, B.A., 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 144, 671-680.

Imai, T., Ohno, T., 1995. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3604-3608.

James, S.A., Collins, M.D., Roberts, I.N., 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 189-194.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A., 1995. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 269-273.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2003. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture* 24, 55-62.

Kapsopoulou, K., Mourtzini A., Anthoulas, M., Nerantzis, E., 2007. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microb. Biot.* 23: 735-739.

Kim, D.H., Hong, Y.A., Park, H.D., 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters* 30, 1633-1638.

King, A., Richard Dickinson, J., 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499-506.

Kocsube, S., Toth, M., Vagvolgyi, C., Doczi, I., Pesti, M., Pocsi, I., Szabo, J., Varga, J., 2007. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *Journal of Medical Microbiology* 56, 190-195.

Kregger-van Rij, N.J.W. 1984. *The Yeasts, a taxonomic study*, B.V. ed. Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam.

Kurita, O., 2008. Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1051-1058.

Kurtzman, C.P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulaspora*. *FEMS Yeast Research* 4, 233-245.

Lafon M., 1955. Contribution à l'étude des formations des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Thèse 3^{ème} cycle, Université Bordeaux 2.

Lafon-Lafourcade, S., 1979. Congrès International Microbiologie et Industries Alimentaires. Apria, Paris.

Lafon-Lafourcade, S., Lucmaret, V., Joyeux, A., Ribereau-Gayon, P., 1981. Use of mixed cultures for production of noble rot wines with reduced volatile acidity. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie d'Agriculture de France* 67, 616-622.

Lafon-Lafourcade, S., Peynaud E., 1965. Sur l'évolution des acides pyruvique et α -cétoglutarique au cours de la fermentation. *C. R. Acad. Sci.*, 261, 1778.

Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon P., 1977. Origines de l'acidité volatile des grands vins liquoreux. *C. R. Acad. Agric.*, 9, 551-558.

Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A., Saez, M.J., 1982. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae* : inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152, 19-25.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*: 21 (Special issue) 97-125 21, 97-125.

Legras, J.L., Karst, F., 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* 221, 249-255.

Lampen, J.O., 1966. Symposium of the Society for General Microbiology, 16, 111.

Lavigne, V., 1996. Recherche sur les composés volatils formés par la levure au cours de la vinification et de l'élevage des vins blancs secs. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 2.

Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., Angulo, L., 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 206-216.

Limtong, S., Imanishi, Y., Jindamorakot, S., Ninomiya, S., Yongmanitchai, W., Nakase, T., 2008. *Torulasporea maleeae* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from Japan and Thailand. *FEMS Yeast Research* 8, 337-343.

Lindner, P., 1895. *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben*. P. Parey, Berlin, Germany.

Llorente, N., de Castro, I.N., 1977. Physiological role of yeasts NAD(P)⁺ and NADP⁺-linked aldehyde dehydrogenases. *Rev Esp Fisiol* 33, 135-142.

Lodder, J., Kregger-van Rij, N.J.W., 1952. *The yeasts : a taxonomic study*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.

Lucca, M.E., Loray, M.A., De Figueroa, L.I.C., Callieri, D.A., 1999. Characterisation of osmotolerant hybrids obtained by fusion between protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* and heat treated protoplasts of *Torulasporea delbrueckii*. *Biotechnology Letters*, 21, 343-348.

- Lucmaret, V., 1980. L'acidité volatile des vins liquoreux. Thèse 3^{ème} cycle, Université Bordeaux.
- Ludovico, P., Sansonetty, F., Corte-Real, M., 2001. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology* 147, 3335-3343.
- Magyar I & Panyik I (1989) Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *Am J Enol Viticult* 40: 233–240.
- Maicas, S., Mateo, J.J., 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 322-335.
- Manjarrez, E.S., Albasi, C., Riba, J.P., 2000. A two-reservoir, hollow-fiber bioreactor for the study of mixed-population dynamics: design aspects and validation of the approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 401-408.
- Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., 1999. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of (beta)-xylosidase activity. *International Journal of Food Microbiology* 46, 105-112.
- Martinez, J., Toledano, F., Millan, C., Ortega, J.M., 1990. Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from Pedro Ximenez grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiology* 7, 217-225.
- Martini, A., Ciani, M., Scorzetti, G., 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 435-440.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2004. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Research* 4, 711-719.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Pons, M., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2006. Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. *FEMS Yeast Research* 6, 268-279.
- Masneuf, I., Dubourdieu, D., 2000. Yeast strains role on the sulphur dioxide combinations of wines obtained from noble rot and raisining grapes. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 34, 27-31.
- Mauricio, J.C., Guijo, S., Ortega, J.M., 1991. Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 301-308.
- McCloskey, L.P., Mahaney, P., 1981. An enzymatic assay for acetaldehyde in grape juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 159-162.
- Mendes Ferreira, A., Clímaco, M.C., Mendes Faia, A., 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components : a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology* 91, 67-71.

- Mendoza, L., de Nadra, M., Farías, M., 2007. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnology Letters* 29, 1057-1063.
- Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina, M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology* 24, 403-412.
- Michnick, S., Roustan, J.-L., Remize, F., Barre, P., Dequin, S., 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* 13, 783-793.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. *Applied and environmental microbiology* 68, 4884-4893.
- Miot-Sertier, C., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *Journal of Applied Microbiology* 102, 555-562.
- Mora, J., Barbas, J.I., Mulet, A., 1990. Growth of yeast microflora during the early stages of the fermentation in inoculated Majorcan musts. *Microbiologia* 6, 65-70.
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* 124, 231-238.
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 103, 285-294.
- Moreno, J.J., Millán, C., Ortega, J.M., Medina, M., 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 7, 181-189.
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150, 199-204.
- Mortimer, R.K., 2000. Evolution and variation of the yeast *Saccharomyces* genome. *Genome Res.* 10, 403-409.
- Munyon, J.R., Nagel, C.W., 1977. Comparison of methods of deacidification of musts and wines. *Am. J. Enol. Viticult.* 28: 79-87.
- Musmanno, R.A., Di Maggio, T., Coratza, G., 1999. Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 87, 932-938.

- Navarro-Aviño, J.P., Prasad, R., Miralles, V.J., Benito, R.M., Serrano, R., 1999. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. *Yeast* 15, 829-842.
- Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 5269-5273.
- Ness, F., Lavalley, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., Dulau, L., 1993. Identification of Yeast Strains Using the Polymerase Chain-Reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62, 89-94.
- Neuberg, C., 1946. The biochemistry of yeast. *Annual Review of Biochemistry* 15, 435-472.
- Nisiotou, A.A., Nychas, G.J.E., 2007. Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Applied and environmental microbiology* 73, 2765-2768.
- Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.J., 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. *Applied and environmental microbiology* 73, 6705-6713.
- Nissen, P., Arneborg, N., 2003. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 180, 257-263.
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331-341.
- Noble, A.C., Bursick, G.F., 1984. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 35, 110-112.
- Nykanen, L., 1986. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 84-96.
- Oda, Y., Tonomura, K., 1995. Molecular genetic properties of the yeast *Torulaspora pretoriensis*. Characterization of chromosomal DNA and genetic transformation by *Saccharomyces cerevisiae*-based plasmids. *Current Genetics* 27, 131-134.
- Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., Fukunaga, M., 1997. A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S–28S rRNA spacer regions. *Yeast* 13, 1243-1250.
- Ohkuni, K., Hayashi, M., Yamashita, I., 1998. Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 623-631.
- Ohshima, Y., Sugaura, T., Horita, M., Sasaki, T., 1987. Industrial application of artificially induced diploid strains of *Torulaspora delbrueckii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1512-1514.
- Ortega, C., Lopez, R., Cacho, J., Ferreira, V., 2001. Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-

flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A* 923, 205-214.

Oura, E., 1977. Reaction products of yeast fermentations - *Process Biochem*, 12:19-21

Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., Forstova, J., 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532-536.

Pardo, I., Garcia, M.J., Zuniga, M., Uruburu, F., 1989. Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. *Applied and environmental microbiology* 55, 539-541.

Perez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 108, 336-345.

Petrik, M., Kappeli, O., Fiechter, A., 1983. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short- and long-term regulation. *J. Gen. Microbiol.* 129, 43-49.

Peynaud, E., Sudraud, P., 1962. Utilisation de l'effet déacidifiant des *Schizosaccharomyces* en vinification de raisins acides. *Ann. Technol. Agr.* 13: 309-328.

Peynaud, E., 1956. Sur la formation d'acétate d'éthyle par les levures de vin. *Industries agricoles et alimentaires* 73, 253-257.

Peynaud, E., Lafourcade, S., 1977. Sur les teneurs en thiamine des vins et jus de raisin. *Ind. Agric. Alim.*, 8, 897-904.

Pigeau, G.M., Inglis, D.L., 2005. Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during Icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 99, 112-125.

Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21, 439-447.

Pineau, B., 2007. Contribution à l'étude de l'arôme fruité spécifique des vins rouges de *vitis vinifera* L. cv. merlot noir et cabernet-sauvignon. Thèse de doctorat n°1484, Université Victor Segalen Bordeaux 2: Bordeaux, France.

Pinto, P.M., Resende, M.A., Koga-Ito, C.Y., Tendler, M., 2004. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 147-152.

Plata, C., Millan, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20, 217-224.

Pommier, S., Albasi, C., Riba, J.P., Delia, M.L., 2002. A new membrane tool for quantifying microorganism interaction dynamics. Application to yeast killer systems. *Desalination* 149, 243-245.

Postel, W., Meier, B., 1983. Während des Bakteriellen äpfersäureabbaus in Wein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 176, 356-359.

Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P., 1989. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 468-477.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4, 865-877.

Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953.

Rankine, B.C., 1966. Decomposition of L-malic acid by wine yeasts. *J. Sci. Food. Agr.* 17: 312-316.

Rankine, B.C., 1969. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis*, 8, 129-134.

Rapp, A., Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Experientia* 42, 873-884.

Ravaglia, S., Delphini, C., 1993. Production of medium chain fatty acids and their ethyl esters by yeasts strains isolated from musts and wines. *Ital. J. Food Sci.* 5, 21-36.

Reed, G., Nagodawithana, T.W., 1988. Technology of yeast usage in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 83-90.

Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M., 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry* 245, 324-333.

Remize, F., Andrieu, E., Dequin, S., 2000. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg²⁺ and mitochondrial K⁺ acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3151-3159.

Remize, F., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., Barre, P., Dequin, S., 1999. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 143-149.

Renouf, V. 2006. Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres - Relation avec la qualité du vin. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 149-164.

Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1208-1219.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P., 1979. *Sciences et Techniques du vin*, Tome 4, Dunod éd., Paris.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. 2004. *Traité d'oenologie*, tome 1 : Microbiologie du vin, vinifications 5e ed. Dunod, Paris.

Richard, P., Bakker, B.M., Teusink, B., vanDam, K., Westerhoff, H.V., 1996. Acetaldehyde mediates the synchronization of sustained glycolytic oscillations in populations of yeast cells. *European Journal of Biochemistry* 235, 238-241.

Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., van Broock, M., Valles, S., Ramón, D., Caballero, A.C., 2004. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology* 96, 84-95.

Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., Bräuer, M., 1992. Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 72, 370-376.

Rojas, V., Gil, J.V., Pinaga, F., Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70, 283-289.

Rojas, V., Gil, J.V., Pinaga, F., Manzanares, P., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 86, 181-188.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003a. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169-180.

Romano, P., Granchi, L., Caruso, M., Borra, G., Palla, G., Fiore, C., Ganucci, D., Caligiani, A., Brandolini, V., 2003b. The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *International Journal of Food Microbiology* 86, 163-168.

Romano, P., Suzzi, G. 1992. Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: Fleet, G., (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood academic publishers Switzerland. 373-393.

Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 73, 126-130.

Romano, P., Suzzi, G., Zironi, R., Comi, G., 1993. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. *Applied and environmental microbiology* 59, 1838-1841.

- Rosi, I., Vinella, M., Domizio, P., 1994. Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Microbiology* 77, 519-527.
- Rosini, G., 1985. Interaction between killer strain of *Hansenula anomala* var. *anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast species. *Can J. Microbiol.* 31, 300-302.
- Rosini, G., Federici, F., Martini, A., 1982. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology* 8, 83-89.
- Roustan, J.L., Sablayrolles, J.-M., 2002a. Modification of the acetaldehyde concentration during alcoholic fermentation and effects on fermentation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93, 367-375.
- Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., 2002b. Impact of the addition of electron acceptors on the by-products of alcoholic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 142-152.
- Rupela, O.P., Tauro, P., 1984. Isolation and characterization of low hydrogen sulphide producing wine yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 6, 419-421.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamon, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research* 157, 267-274.
- Salmon JM, Languet P., Ortiz-Julien A., 2007. Colture miste di lieviti e fermentazione alcolica. *Riv Viticolt Enolog* 3: 1–5.
- Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.C., Bely, M., Barre, P., 1993. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 56-64.
- Sangorrin, M.P., Lopes, C.A., Giraudo, M.R., Caballero, A.C., 2007. Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology* 119, 351-357.
- Santamaria, P., Garijo, P., Lopez, R., Tenorio, C., Rosa Gutierrez, A., 2005. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology* 103, 49-56.
- Santos, J., Sousa, M.J., Cardoso, H., Inacio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., Leao, C., 2008. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology* 154, 422-430.
- Sasaki, T., Ohshima, Y., 1987. Induction and characterization of artificial diploids from the haploid yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1504-1511.
- Schanderl H., 1959. *Microbiology of must and wine*. Eugen Uhmer Verlag, Stuttgart.
- Schmitt, H.D., Ciriacy, M., Zimmermann, F.K., 1983. The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. *Molecular and General Genetics* MGG 192, 247-252.

Schütz, M., Gafner, J., 1994. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology* 19, 253-257.

Sharma, S., Tauro, P., 1986. Control of ethanol production by yeast: Role of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. *Biotechnology Letters* 8, 735-738.

Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R.G., Bohnert, A.H.J., 1999. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and Sorbitol in yeast. *Plant Physiol.* 121, 45-52.

Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K., Takano, H., 1999. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* Trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2841-2846.

Shimazu, Y., Watanabe, M., 1981. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must fermentation. *Journal of Fermentation Technology* 59, 27-32.

Shimizu, K., (Ed.) 1993. *Killer Yeasts*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F., 2000. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 90-97.

Siewewerts, S., de Bok, F.A.M., Hugenholtz, J., van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4997-5007.

Singer, M.A., Lindquist, S., 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology* 16, 460-468.

Snow, P.G., Gallander, J.F., 1979. Deacidification of White Table Wines Through Partial Fermentation with *Schizosaccharomyces Pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 45-48.

Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., Henschke, P.A., 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 21-30.

Sousa-Dias, S., Goncalves, T., Leyva, J.S., Peinado, J.M., Loureiro-Dias, M.C., 1996. Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophily in *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology* 142, 1733-1738.

Sponholz, W., 1993. Wine spoilage by microorganisms. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood. Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 395-420.

Spor, A., Wang, S., Dillmann, C., de Vienne, D., Sicard, D., 2008. « Ant » and « Grasshopper » Life-History Strategies in *Saccharomyces cerevisiae* PLOS ONE 3, 1579.

- Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., Rensburg, P.v., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91, 182-190.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 102, 10-21.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 139-173.
- Tamás, M.J., Karlgren, S., Bill, R.M., Hedfalk, K., Allegri, L., Ferreira, M., Thevelein, J.M., Rydstram, J., Mullins, J.G.L., Hohmann, S., 2003. A Short Regulatory Domain Restricts Glycerol Transport through Yeast Fps1p. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6337-6345.
- Tamás, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C.W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J.M., Hohmann, S., 1999. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular Microbiology* 31, 1087-1104.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., Ingledew, W.M., 2002. Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1616-1623.
- Thorsen, M., Di, Y., Tangemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., Wysocki, R., Tamas, M.J., 2006. The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol. Biol. Cell* 17, 4400-4410.
- Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Gachons, C.P.D., Dubourdieu, D., 2000. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 178-181.
- Tominaga, T., Darriet, P., Dubourdieu, D., 1996. Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis*, 35, 207.
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D., 1998. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 5215-5219.
- Toriya, M.a.J.s., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozas, N., Mas, A., Guillaman, J.M., 2003. Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: study of their buffering capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 916-922.
- Toro, M.E., Vazquez, F., 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 347-354.

- Urk, H., Bruinenberg, P.M., Veenhuis, M., Scheffers, W.A., Dijken, J.P., 1989. Respiratory capacities of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 grown under glucose limitation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 56, 211-220.
- Van der Walt, J.P., 1970. *Saccharomyces* emend. Rees. p 555-718. In J. Lodder (ed), *The yeasts : a taxonomic study*, 2nd ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Van der Walt, J.P., Johannsen, E., 1975. The genus *Torulaspota* Lindner. *Counc. Sci. Ind. Res. Rep. Pretoria* 325, 1-23.
- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M., 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 109-115.
- Van Vuuren, H.J.J., Jacobs, C.J., 1992. Killer yeasts in the wine industry: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 119-128.
- Vasserot, Y., Christiaens, H., Chemardin, P., Arnaud, A., Galzy, P., 1989. Purification and properties of a BT-glucosidase of *Hanseniaspora vineae* Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. *Journal of Applied Microbiology* 66, 271-279.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 136, 395-403.
- Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P., 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25, 778-785.
- Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sa-Correia, I., Novais, J.M., 1989. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 21-28.
- Villena, M.A., Iranzo, J.F.U., Perez, A.I.B., 2007. Beta-glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 420-425.
- Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-van der Vegte, W.H., van Dijken, J.P., 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Applied and environmental microbiology* 56, 3785-3792.
- Withing, G.C., 1976. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages : a review. *Journal of the Institute of Brewing* 82, 84-92.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 376-384.

- Yap, N.A., de Barros Lopes, M., Langridge, P., Henschke, P.A., 2000. The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 89, 381-389.
- Yarrow, D., 1984. *Saccharomyces* Meyen ex Rees, p 379-395. In N.J.W. Kregger-van Rij (ed), *The yeasts : a taxonomic study*, 3rd ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- Yokoigawa, K., Murakami, Y., Kawai, H., 1995. Trehalase activity and trehalose content in a freeze-tolerant yeast, *Torulasporea delbrueckii*, and its freeze-sensitive mutant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2143-2145.
- Yokotsuka, K., Otaki, A., Naitoh, A., Tanaka, H., 1993. Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of a high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 371-377.
- Young, T.W. 1987. *The yeasts. Volume 2. Yeasts and the environment.*
- Yu, J.R., Chung, J.S., Chai, J.Y., 1997. Different RAPD patterns between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus Miyata* type. *Korean Journal of Parasitology* 35, 295-298.
- Zagorc, T., Maráz, A., Cadez, N., Jemec, K.P., Péter, G., Resnik, M., Nemanic, J., Raspor, P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology* 18, 441-451.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., Dellaglio, F., 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology* 40, 351-355.
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., Comi, G., 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 15, 235-238.
- Zohre, D.E., Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry* 38, 319-324.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125, 197-203.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology* 27, 559-567.
- Zyl, P.J., Prior, B.A., 1990. Water relations of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 12-17.

Liste des publications

• Publication scientifique dans revue internationale à comité de lecture

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 134, 201-210.

• Communication orale en congrès internationaux

P. Renault, M. Marullo, L. Lagarrigue, A. Lonvaud-Funel and M. Bely. Phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: potential applications in wine industry. SASEV 4th International conference, Cape Town, South Africa, 28-30 July 2009.

• Communications affichées en congrès internationaux

P. Renault, M. Ehsani, T. Van Der Westhuizen, M. Bely. The non-*Saccharomyces* and their expression during alcoholic fermentation: the specific case of *Torulaspota delbrueckii*. 14th Australian Wine Industry Technical Conference » Adelaide, Australia, 3 - 8 July 2010.

P. Renault, C. Miot-Sertier, P. Marullo, L. Lagarrigue, A. Lonvaud-Funel, M. Bely. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species. International Specialized Symposium on Yeasts ISSY27, Août 2009, Paris, France.

P. Renault, M. Marullo, L. Lagarrigue, A. Lonvaud-Funel and M. Bely. Phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: potential applications in wine industry. SASEV 4th International conference, Cape Town, South Africa, 28-30 July 2009.

• **Publication dans revue de vulgarisation**

P. Renault, M. Ehsani, M. Bely. Les non-*Saccharomyces* et leur expression lors de la fermentation alcoolique : cas spécifique de *Torulaspota delbrueckii*. Revue Française d'Oenologie, RFOE n°242 thème vinification, 2010_06_01.

M. Ehsani, P. Renault, P.K. Bowyer, M. Bely. Non-Saccharomyces yeasts and their expression during alcoholic fermentation: the specific case of *Torulaspota delbrueckii*. The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker, Annual Technical Issue 2010, p81-87.