

Adaptation des itinéraires de vinification en fermentation

Première exploration du potentiel fermentaire et aromatique de deux variétés de raisins résistants



Lisa PIROU

Stage encadré par **Jean-Roch Mouret**, **Erick Casalta** et **Christian Picou**

jean-roch.mouret@inrae.fr - erick.casalta@inrae.fr - christian.picou@inrae.fr

Unité mixte de recherche Science pour l'œnologie (UMR SPO)

Institut Agro, 2 Place Pierre Viala - 34060 Montpellier

Master Interactions Microorganismes - Hôtes et Environnement 2021 - 2022

HAA010V : Stage de Master 2 en entreprise



INRAE

**L'INSTITUT
agro Montpellier**



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de la Chaire Vigne et Vin d'avoir accepté de me faire confiance pour ce projet et fourni le matériel nécessaire pour le mener à bien. Merci en particulier Anne Julien-Ortiz de l'entreprise Lallemand et Olivier Zekri du Groupe Mercier.

J'aimerais aussi remercier Fabienne Remize, la directrice de l'unité, et Agnès Masquin pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR Sciences pour l'œnologie.

Je souhaite remercier particulièrement Jean-Roch Mouret en tant que maître de stage pour sa confiance, sa disponibilité et les connaissances qu'il a su partager avec moi.

Je voudrais aussi remercier Erick Casalta pour la confiance qu'il m'a accordé et l'autonomie qu'il m'a offert pendant ce stage.

Un grand merci à Christian Picou et Faïza Macna pour nous avoir appris à réaliser les fermentations et pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Merci à Marc Perez pour ses conseils et son aide.

J'aimerais aussi remercier les enseignants et l'équipe pédagogique du Master Interactions Microorganismes-Hôtes, Environnement qui nous ont fourni les outils et connaissances nécessaires au bon déroulement de ce stage.

Enfin, je souhaite remercier ma collègue de stage Emma Bonnaud qui m'a aidé tout au long de ce stage (notamment pour trouver des mots pompeux à mettre dans le rapport!) et qui a été présente quand ma belle Mégane ne l'était plus. (Et merci pour les biscuits aussi !)

Merci aussi à Sylvia pour toutes les anecdotes que tu nous a raconté et surtout le petit concert au ukulélé. Merci à Marion d'avoir occupé Emma avec tes comptages, tes questions et R, elle avait trop de temps libre. Merci à Fabien pour la limonade et surtout, merci à vous trois pour votre bonne humeur et votre folichonnerie !

Enfin, je souhaite remercier l'ensemble des membres de l'unité pour leur accueil, leur disponibilité et conseils ainsi que pour la bonne humeur qu'ils ont su partager au quotidien.

Abréviations

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

LSA : Levure sèche active

IP : Iodure de propidium

PBS : Solution tampon de phosphate salin

Ren : Résistance à *Erysiphe necator*

Rpv : Résistance à *Plasmopara viticola*

Run : Résistance à *Uncinula necator*

Figures et tableaux

Tableau 1 : Gènes de résistance des variétés Floréal et Sauvignac contre le mildiou et l'oïdium

Figure 1 : Métabolisme carboné de *S. cerevisiae* en conditions de fermentation alcoolique

Figure 2 : Voies métaboliques de la synthèse d'arômes fermentaires par *S. cerevisiae*

Tableau 2 : Caractéristiques des moûts initiaux

Figure 3 : Schéma du dispositif de fermentation utilisé

Figure 4 : Analyse en composantes principales (ACP)

Tableau 3 : Effets du niveau de bourbes ajoutées et de la souche de levure sur les différents paramètres fermentaires

Figure 5 : Evolution de la cinétique fermentaire (dCO_2/dt) des trois souches de levures

Figure 6 : Vitesses maximales de dégagement de CO_2

Figure 7 : Quantité de sucre résiduel mesuré en fin de fermentation

Figure 8 : Viabilité des levures mesurée par cytométrie en flux à 80% d'avancement de la fermentation

Figure 9 : Concentrations finales en métabolites du métabolisme carboné central

Figure 10 : Concentrations finales en arômes fermentaires

Sommaire

Introduction	1
A. Les raisins Floréal et Sauvignac	1
1. Sélection variétale et création de variétés de raisins résistants	1
B. La vinification	2
1. Les étapes clés de la vinification	2
2. La fermentation alcoolique	2
C. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1. Description	3
2. Les voies métaboliques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
Matériels et méthodes	7
Résultats	11
A. Vision globale des résultats par ACP	11
B. Vision détaillée	12
Discussion	18
A. Effets du niveau d'ajout de bourbes	18
B. Effets de la souche de levure utilisée	20
C. Effets de l'interaction entre le niveau d'ajout de bourbes et la souche de levure utilisée	22
Conclusion	23
Bibliographie	24

Tableau 1 : Gènes de résistance des variétés Floréal et Sauvignac contre le mildiou et l'oïdium (d'après Schneider *et al.*, 2019 ; Wingerter *et al.*, 2021).

Maladie (agent infectieux)	Floréal	Sauvignac
Mildiou (<i>Plasmopara viticola</i>)	<i>Rpv1 + Rpv3</i>	<i>Rpv3.1 + Rpv12</i>
Oïdium (<i>Erysiphe necator</i>)	<i>Run1 + Ren3</i>	<i>Ren3 + Ren9</i>

Abréviations : *Rpv* : Résistance à *Plasmopara viticola* ; *Run* : Résistance à *Uncinula necator* (synonyme d'*Erysiphe necator*) ; *Ren* : Résistance à *Erysiphe necator*.

Introduction

A. Les raisins Floréal et Sauvignac

1. Sélection variétale et création de variétés de raisins résistants

La sélection variétale est une méthode d'amélioration consistant au croisement de plantes présentant des caractères d'intérêt pour obtenir un hybride. Par exemple, il est possible de croiser des plantes résistantes à des maladies ou conditions environnementales extrêmes avec des plantes d'intérêt pour l'agriculture.

Au sein de la filière œnologique, l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*) sont responsables de maladies cryptogamiques causant d'importants problèmes de rendements dans les cultures contaminées. Ainsi, dès la fin du XIXe siècle, les sélectionneurs ont commencé à croiser *Vitis rotundifolia*, d'Amérique du Nord, avec *Vitis vinifera*, l'espèce utilisée pour la production de raisins (**Gadoury et al., 2012 ; Salinari et al., 2006 ; Schneider et al., 2019**) avec pour objectif de transférer les capacités de résistance naturellement présentes dans les vignes « sauvages » aux variétés « cultivées ».

Aujourd'hui, ces croisements sont à l'origine de certaines variétés résistantes telles que le Floréal et le Sauvignac dont il sera question dans ce rapport.

L'INRAE a travaillé, au cours du projet Resdur1 lancé en 2000, sur la sélection de cultivars résistants à certaines maladies. Ce projet a permis l'inscription au catalogue de quatre variétés résistantes, dont le Floréal en 2018 (**Schneider et al., 2019**).

Le Floréal est une variété de raisin blanc issue du croisement entre deux variétés : le Villaris, sélectionné par l'Institut JKI du Geilweilerhof, portant déjà des facteurs de résistance et le Mtp 3159-2-12, obtenu par introgression de la source de résistance *V. Rotundifolia* à l'INRAE de Montpellier. Il présente une résistance polygénique au mildiou (*Rpv1 + Rpv3*) et à l'oïdium (*Run1 + Ren3*) (**Tableau 1 ; INRAE, 2018 ; Schneider et al., 2019**).

Le Sauvignac est une autre variété de raisin blanc résistant aux maladies cryptogamiques. Cette variété a été obtenue par Valentin Blattner en 1991 par croisement d'un hybride non identifié avec le descendant d'un croisement d'un Sauvignon avec un Riesling. Elle a été ajoutée au catalogue des variétés en 2020 par les Pépinières Mercier. Comme le Floréal,

le Sauvignac présente une résistance polygénique au mildiou (*Rpv3* + *Rpv12*) et à l'oïdium (*Ren3* + *Ren9*) (**Tableau 1 ; Mercier Frères, 2020 ; Wingerter et al., 2021**).

Ces nouvelles variétés présentent donc un intérêt agronomique puisqu'elles permettent de réduire le nombre de traitements phytosanitaires nécessaires. Cependant, la compréhension de leurs comportements en fermentation reste un critère important pour la commercialisation du vin issu de ces nouvelles variétés.

B. La vinification

1. Les étapes clés de la vinification

La vinification est la transformation d'un jus de raisin, aussi appelé moût, en un vin présentant des caractéristiques organoleptiques spécifiques. Elle commence lors de la vendange des baies de raisin. Le raisin est ensuite éraflé puis foulé pour extraire le moût sans écraser les pépins. Dans le cas du vin blanc, le raisin est pressé puis le moût obtenu est clarifié puis mis à fermenter (**Dwyer et al., 2014**). Au cours de la clarification, les particules solides sont plus ou moins séparées du moût selon le niveau de clarification appliqué. Ces particules solides notées « bourbes » comprennent les pépins et la pellicule des raisins et jouent un rôle important pour la croissance des levures. Le vin obtenu après la fermentation peut ensuite être mûré ou stabilisé avant la mise en bouteille.

2. La fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est généralement initiée par levurage (ajout de levures *S. cerevisiae* sous forme de levures sèches actives), pour permettre un meilleur contrôle du procédé.

Pendant la fermentation alcoolique, les levures convertissent les sucres du moût du raisin en dioxyde de carbone et en éthanol selon la réaction suivante :



Des métabolites secondaires tels que les arômes fermentaires sont aussi produits pendant la fermentation mais leur synthèse dépend du moût et des levures utilisées.

Le moût de raisin contient généralement 150 à 260 g/L de fructose et glucose en concentrations équimolaires. L'azote, les minéraux, vitamines et lipides sont aussi des éléments essentiels pour la fermentation, même si leurs concentrations dépendent des

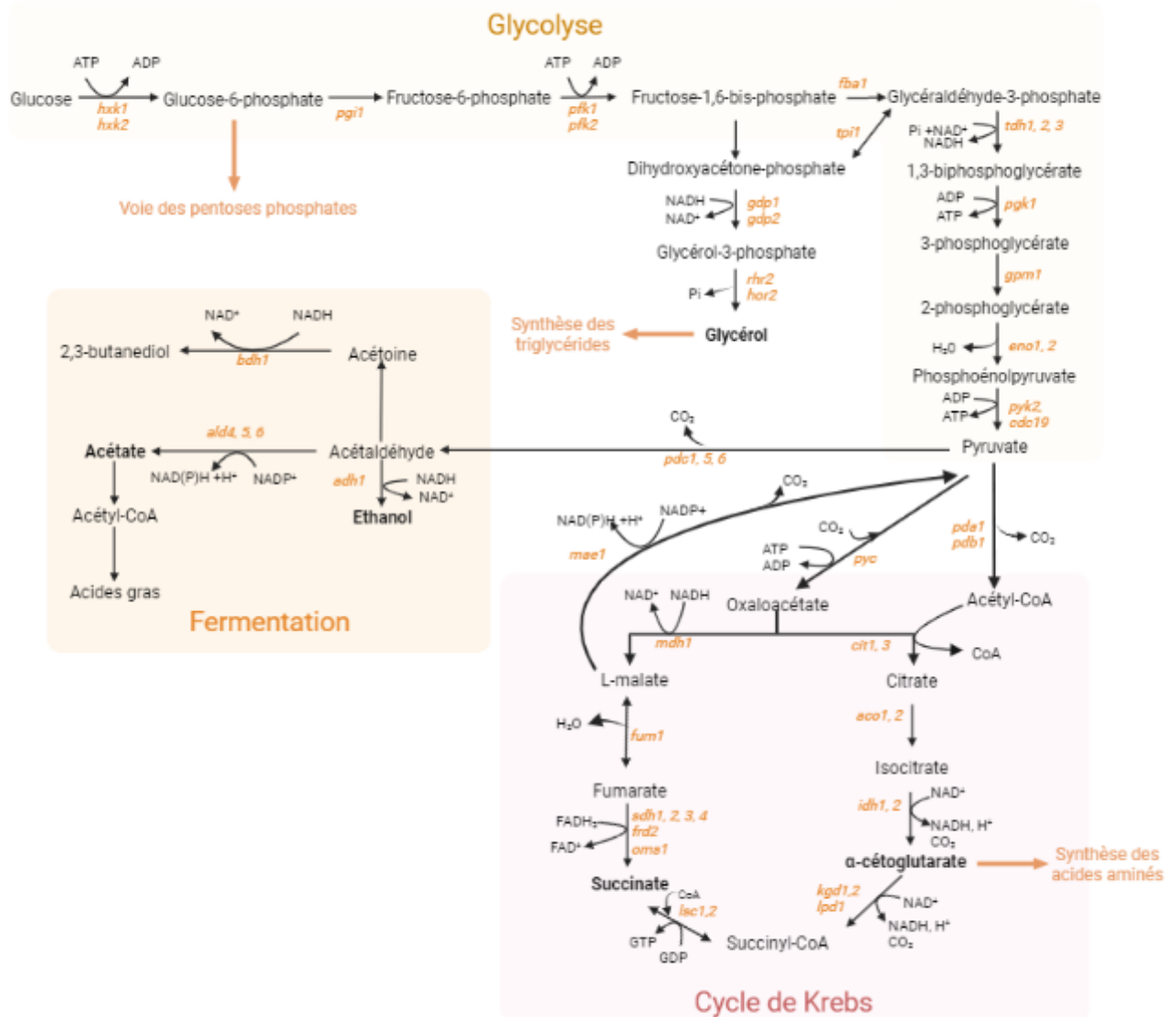


Figure 1 : Métabolisme carboné de *S. cerevisiae* en conditions de fermentation alcoolique (d'après Rollero, 2015).

La majorité du pyruvate produit lors de la glycolyse est converti en éthanol lors de la fermentation, le reste rejoint le cycle de Krebs modifié en conditions fermentaires et permet la synthèse de succinate.

Abréviations : *hvk* : Hexokinase ; *pgi1* : Glucose-6-phosphate isomérase ; *pfk* : Phosphofruktokinase-6 ATP dépendante, *fba1* : Fructose-1,6-bisphosphate aldolase ; *tpi1* : triosephosphate isomérase ; *gdp* : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase ; *rhr* : DL-glycérol-3-phosphatase ; *hor* : DL-glycérol-3-phosphate phosphatase ; *tdh* : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; *pgk* : Phosphoglycérate kinase ; *gpm* : Phosphoglycératemutase ; *eno* : Phosphopyruvate hydratase ; *pyk* : Pyruvate kinase ; *cdc* : Pyruvate kinase ; *pdc* : Pyruvate décarboxylase ; *bdh* : Butanediol déshydrogénase ; *ald* : Aldéhyde déshydrogénase ; *adh* : Alcool déshydrogénase ; *pyc* : Pyruvate carboxylate isoenzyme ; *pda* : Sous-unité alpha de la pyruvate déshydrogénase E1 ; *pdb1* : Sous-unité beta de la pyruvate déshydrogénase E1 ; *cit* : Citrate synthase ; *aco* : Aconitate hydratase ; *idh* : Isocitrate déshydrogénase ; *KGD* : Dihydrolipoyl transsuccinylase ; *lpd* : Dihydrolipoyl déshydrogénase ; *isc* : Succinyl-CoA ligase ; *sdh* : Succinate déshydrogénase ; *frd* : Fumarate réductase soluble ; *oms1* : Suppresseur multicopie Oxa1 ; *fum* : Fumarate hydratase ; *mdh* : Malate déshydrogénase ; *mae* : Enzyme malique.

variétés, dates de récolte et sites de culture (**Fleet, 2002 ; Seguinot, 2019**). En cas de carence de l'un de ces derniers nutriments, la fermentation peut être lente, languissante ou bloquée.

La fermentation est un processus anaérobie et se déroule généralement en trois phases : la phase de latence pendant laquelle les levures s'acclimatent à leur environnement, la phase de croissance et la phase stationnaire au cours de laquelle les levures cessent de se multiplier mais continuent la fermentation. C'est pendant la phase stationnaire que la plus grande partie de la conversion du sucre en éthanol et CO₂ est réalisée (**Seguinot, 2019**).

C. *Saccharomyces cerevisiae*

1. Description

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires dont la reproduction peut être sexuée ou asexuée. *S. cerevisiae* est une espèce aérobie facultative Crabtree positive, c'est-à-dire qu'elle peut se développer rapidement par fermentation lorsque les concentrations en sucre sont élevées, même en présence d'oxygène (**Malina et al., 2021**).

2. Les voies métaboliques de *Saccharomyces cerevisiae*

Métabolisme carboné en conditions fermentaires

S. cerevisiae est adaptée aux conditions de fermentation alcoolique, que ce soit le pH acide, la concentration en sucres initiale élevée ou la forte concentration en éthanol en fin de fermentation (**Seguinot, 2019**). En conditions fermentaires, l'ATP nécessaire au développement cellulaire est produit au cours de la glycolyse (**Figure 1**). La glycolyse mène à la synthèse de pyruvate qui est ensuite principalement converti en acétaldéhyde puis réduit en éthanol ; une autre partie de l'acétaldéhyde participant à la synthèse d'acétyl-CoA et d'acides gras (**Fraenkel, 1986**). Pendant la fermentation, le cycle de Krebs fonctionne comme deux voies parallèles avec le succinate comme produit final (**Seguinot, 2019**). La branche réductrice permet la production de la majorité du succinate produit tandis que la branche oxydative permet la synthèse d' α -cétoglutarate, utilisé pour le métabolisme azoté (**Bell et Henschke, 2005**). Le glucose peut aussi être converti en glycérol qui permet de limiter le stress osmotique dû à la concentration importante en sucres au début de la fermentation (**Seguinot, 2019**).

Métabolisme azoté en conditions fermentaires

L'azote assimilable, issu des acides aminés et de l'ammonium, est un élément essentiel de la fermentation puisqu'il conditionne la vitesse maximale de fermentation, le développement des levures et la production d'arômes (**Bely et al., 1990 ; Rollero, 2015**). En conditions optimales, les levures se multiplient jusqu'à l'épuisement de l'azote assimilable dans le milieu. Les acides aminés peuvent être directement utilisés pour la synthèse des protéines ou dégradés en libérant de l'azote sous forme d'ammonium ou de glutamate et de céto-acides. Ces céto-acides peuvent rejoindre le métabolisme carboné, être utilisés pour la synthèse d'acides aminés *de novo* ou utilisés dans la voie d'Ehrlich lors de la synthèse d'arômes fermentaires. Le glutamate et l'ammonium libérés peuvent ensuite être utilisés dans le métabolisme central azoté. Si l'azote assimilable n'est pas suffisant (< 150 mg/L), la cinétique de fermentation est qualifiée de lente. Au contraire, plus un moût est riche en azote, plus les besoins en lipides des levures seront élevés, un déséquilibre trop important pouvant causer une carence en lipides (**Casalta et al., 2019**).

Le rôle des lipides

Les stérols jouent un rôle essentiel pour le maintien de la structure de la membrane plasmique des organismes eucaryotes et sont donc importants pour le métabolisme, la croissance et la viabilité des levures (**Casalta et al., 2016**). Deux sources de stérols sont particulièrement utilisées par *S. cerevisiae* au cours de la fermentation : l'ergostérol, produit en conditions aérobies par la levure, et les phytostérols, issus du moût de raisin et assimilés par la levure en conditions anaérobies. Parmi les phytostérols, les plus communs sont le β -sitostérol, le stigmastérol et le campestérol. Les levures ne pouvant pas synthétiser de stérols en condition d'anaérobiose, il leur est nécessaire d'assimiler les phytostérols présents dans le moût de raisin et plus particulièrement dans les particules solides du moût (**Girardi Piva et al., 2022**). En effet, leur assimilation permet de compenser partiellement le manque d'oxygène et de synthèse d'acides gras à longue chaîne pendant la fermentation anaérobie (**Ochando et al., 2017**). Ainsi, en fonction des souches de levures utilisées, les concentrations en phytostérols nécessaires au début de la phase de croissance peuvent varier entre 2 et 8 mg.L⁻¹ (**Ochando et al., 2017**). Une carence en stérols et en acides gras limite la multiplication des cellules de levure au cours de la phase de croissance (**Girardi Piva et al., 2022**).

Les stérols et les acides gras contribuent fortement à l'adaptation de *S. cerevisiae* aux stress fermentaires tels que les toxicités causées par les concentrations élevées en sucre ou en éthanol en début et fin de fermentation (**Girardi Piva et al., 2022**).

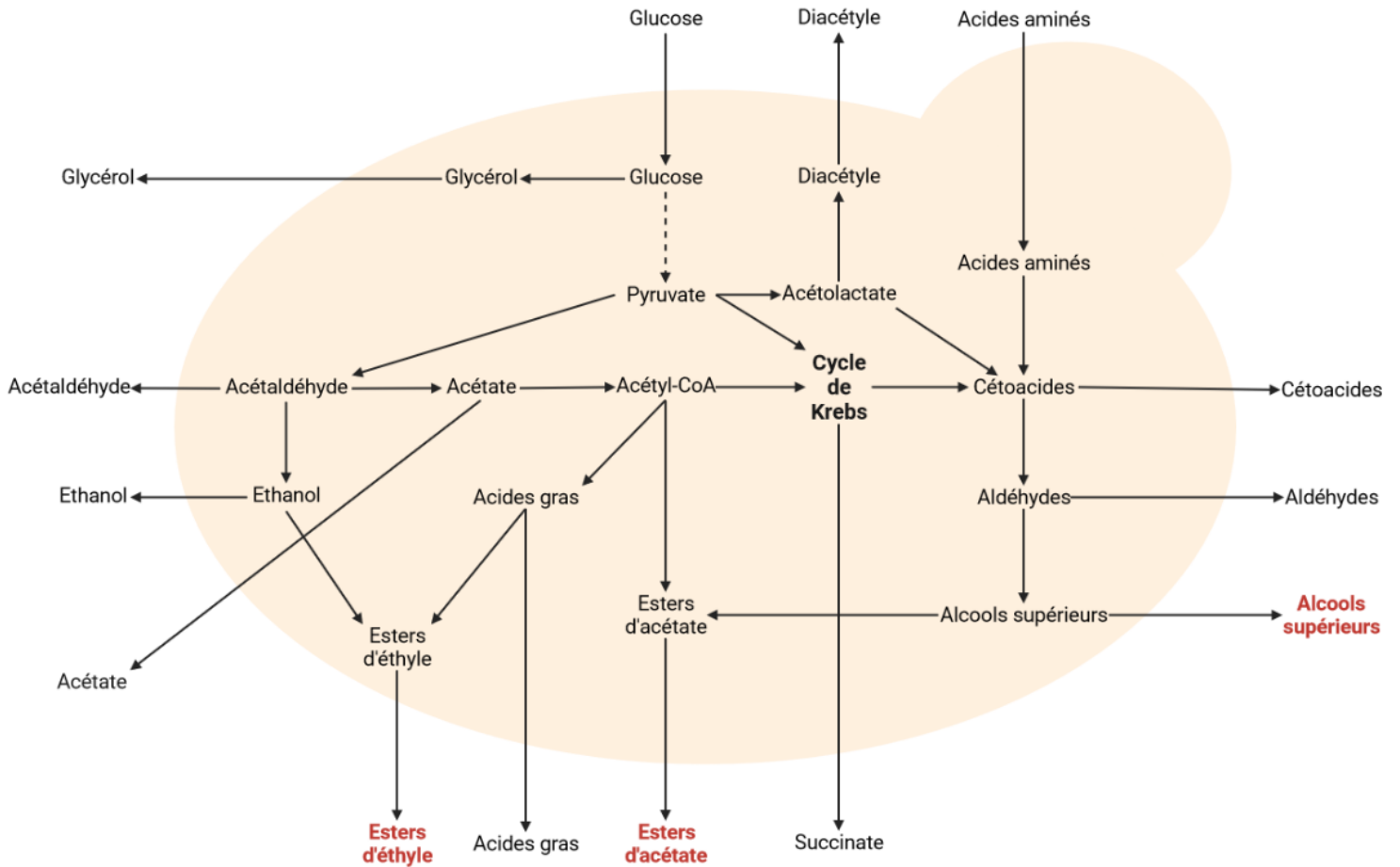


Figure 2 : Voies métaboliques de la synthèse d'arômes fermentaires par *S. cerevisiae* (d'après Swiegers *et al.*, 2005).

Les alcools supérieurs sont produits à partir des cétoacides issus de la voie des acides aminés et du cycle de Krebs. Les esters d'éthyles sont produits à partir des acides gras tandis que les esters d'acétates sont produits à partir des alcools supérieurs.

La population atteinte au cours de la phase stationnaire et la vitesse de fermentation maximale sont en partie conditionnées par la concentration du moût en lipides puisque ceux-ci participent à l'assimilation de l'azote. De plus, une perte de viabilité importante est observée lorsque les moûts présentent une faible concentration en lipides (**Ochando et al., 2017**). Ces molécules permettent aux levures de tolérer des concentrations élevées d'éthanol et réduisent les risques de fermentation languissante ou de blocage de la fermentation (**Casalta et al., 2016**).

Ainsi, d'un point de vue opérationnel, dans le cas d'une clarification trop importante, la fermentation peut être limitée par la concentration en lipides ; sa cinétique est alors qualifiée de « languissante » à cause d'une baisse de viabilité (**Girardi Piva et al., 2022**).

Les arômes

Les arômes sont des molécules volatiles perceptibles par l'humain lorsque leur concentration dépasse le seuil de perception parfois très faible. Dans le vin, il existe plusieurs types d'arômes : les variétaux, présents sous forme libre ou en tant que précurseurs dans le moût ; les fermentaires, produits lors de la fermentation par les levures et les arômes de vieillissement, formés par réaction chimique pendant la maturation du vin.

Les esters et les alcools supérieurs sont des composés volatils qui représentent la majorité des arômes fermentaires produits par *S. cerevisiae*. Leur synthèse dépend du métabolisme des sucres et de celui de l'azote (**Figure 4 ; Swiegers et al., 2005**)

En faible concentration (≤ 300 mg/L), les alcools supérieurs participent au caractère fruité du vin, cependant, lorsque leur concentration dépasse 400 mg/L, ils peuvent entraîner une odeur désagréable (**Bell et Henschke, 2005**).

Les esters peuvent être des dérivés des alcools supérieurs, ce sont alors des esters d'acétate. Ils peuvent aussi être synthétisés à partir d'acides gras, il est alors question d'esters d'éthyle (Seguinot, 2019). Les esters d'acétate participent aux notes florales et fruitées des vins jeunes tandis que les esters d'éthyle contribuent aux notes fruitées.

D. Objectifs du stage

Le potentiel œnologique (cinétique fermentaire et production d'arômes) des nouvelles variétés résistantes aux maladies n'est pas encore entièrement connu. La recherche menée au cours de ce stage consistera donc à évaluer différents itinéraires de

vinification pour deux variétés résistantes de raisin blanc (Sauvignac et Floréal). Deux concentrations initiales en bourbes et trois souches de levures seront testées pour déterminer quelles sont les conditions de fermentation permettant d'optimiser le potentiel de chaque variété de raisin.

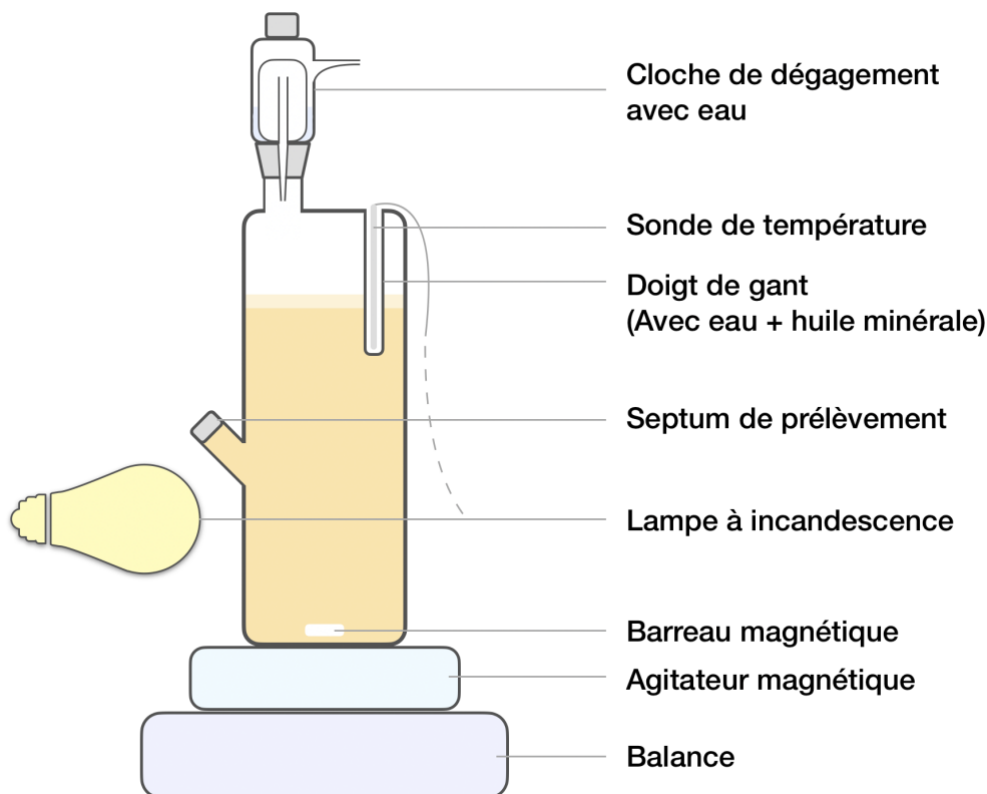


Figure 3 : Schéma du dispositif de fermentation utilisé. Le fermenteur d'1,2L est rempli avec un litre de moût de raisin et 1% ou 3% de bourbes ajoutées (v/v) et le moût est homogénéisé par agitation magnétique pendant toute la fermentation. La température mesurée par la sonde de température placée dans le doigt de gant régule l'activation ou non de la lampe à incandescence placée derrière le fermenteur, la salle de fermentation étant climatisée et réglée sur 2°C en dessous de la fermentation à la plus basse température. Les prélèvements sont réalisés à travers le septum à l'aide d'une seringue pour maintenir l'anaérobiose. La cloche de dégagement avec eau permet le dégagement du CO₂ produit sans laisser entrer d'air.

Tableau 2 : Caractéristiques des moûts initiaux.

Moût	Acides aminés (mg.L ⁻¹)	Ammonium (mg.L ⁻¹)	Azote assimilable total (mg.L ⁻¹)	Sucre initial (g.L ⁻¹)	Teneur en stérols totaux dans les bourbes (mg.g MH ⁻¹)	Teneur en stérols totaux pour 1% de bourbes ajoutées (mg.L ⁻¹)	Teneur en stérols totaux pour 3% de bourbes ajoutées (mg.L ⁻¹)
Floréal	198	25	223	259	0,085	0,851	2,55
Sauvignac	188	32	220	242	0,113	1,132	3,39

Abréviation : MH : Masse humide.

Matériels et méthodes

Variétés de raisin

Les variétés résistantes utilisées sont deux raisins blancs, le Floréal et le Sauvignac.

Lors des vendages 2021, les raisins ont été foulés et pressés à l'unité expérimentale de Pech Rouge. Les moûts bruts ont ensuite été clarifiés par sédimentation pendant une nuit à 4°C puis le moût est soutiré afin de le séparer des bourbes. Ainsi, pour chaque variété, un moût de raisin très fortement clarifié et des bourbes concentrées ont été obtenus. Ces différentes solutions liquides ont été congelées à -20°C jusqu'à utilisation.

Souches de levure

Les trois souches de levures sèches actives (LSA) utilisées sont fournies par l'entreprise Lallemand (Blagnac, France) et sont notées LSA1, LSA2 et LSA3 par soucis de confidentialité. Elles appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Les fermenteurs sont inoculés avec 20g.L⁻¹ de LSA réhydratée pendant 30 minutes à 37°C dans une solution de 50 g.L⁻¹ de glucose (1g de LSA dans 10 mL de solution glucosée).

Conditions de fermentation

Les moûts sont fermentés dans des bouteilles cylindriques en verre de 1,2L (bioréacteurs non commerciaux) équipées d'une cloche remplie d'eau afin de permettre le dégagement de CO₂ tout en maintenant l'anaérobiose (**Figure 3**). Les bioréacteurs sont remplis avec 1L de moût et 10 ou 30 mL de bourbes (correspondant respectivement à 1 et 3% de bourbes). Les moûts sont fermentés en conditions isothermes à 20°C. Pour cela, les fermenteurs sont placés dans une pièce climatisée et sont équipés d'une sonde de température ainsi que d'une lampe chauffante. Un système de régulation déclenche l'allumage de lampe chauffante si la température du milieu est inférieure à la consigne, ou son arrêt si elle est supérieure. Des échantillons sont prélevés au cours de la fermentation, à 80 % d'avancement et à la fin de la fermentation.

Suivi de la cinétique de fermentation

Chaque fermenteur est placé sur une balance. Le suivi automatique (toutes les 20 minutes) du poids permet de calculer la quantité de CO₂ libérée. La vitesse de production de CO₂ est calculée sur la base d'un lissage polynomial (**Sablayrolles et al., 1987**).

Dénombrement cellulaire

Les échantillons des fermentations sont d'abord dilués (2 500 fois) avec de l'Isoton II® (Beckman-Coulter, Margency, France). Après sonication (30s, 10W), les cellules sont

comptées à l'aide d'un compteur électronique Coulter Z2 (Coulter Multisizer4e, Beckman Coulter, Fullerton, Californie, États-Unis) équipé d'une sonde d'ouverture de 100 mm. Le dénombrement cellulaire est réalisé à fréquence régulière pendant la fermentation, les valeurs présentées sont celles correspondant aux prélèvements réalisés à 80% d'avancement de la fermentation.

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est mesurée par cytométrie en flux à partir d'échantillons prélevés à 80% d'avancement de la fermentation (C6 Accuri, St Ives, Cambs, Royaume-Uni). Les échantillons sont centrifugés (3 min à 10 000 rpm). Les surnageants sont remplacés par une solution tampon de phosphate salin (PBS). Pour la coloration des cellules mortes, l'iodure de propidium (IP) est ajouté à la suspension cellulaire (5 µL de PI à 100 mg/mL dans 500 µL d'échantillon centrifugé et dilué). Les solutions sont ensuite mélangées et incubées 10 min à température ambiante à l'obscurité. Le mélange est ensuite placé sur de la glace avant la mesure de fluorescence par cytométrie en flux. L'iodure de propidium permet une coloration fluorescente des acides nucléiques et ne peut pas traverser les membranes cellulaires intactes. La fluorescence de l'iodure de propidium (excitation avec un laser de 488 nm, émission de 575 nm) est collectée via un filtre passe-large de 670 nm (Fluorescence 3).

Métabolisme central carboné

La mesure des concentrations en glucose, fructose, éthanol, glycérol, acétate, lactate, malate et en succinate est réalisée à partir d'échantillons prélevés en fin de fermentation par HPLC (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, États-Unis) à 60°C sur une colonne de ROA de Phenomenex Rezex (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, États-Unis). La colonne est ensuite éluée avec 0,005 N H₂SO₄ à un débit de 0,6 mL/min. La concentration de l'acide acétique est déterminée à l'aide d'un compteur UV à 210 nm ; les concentrations des autres composés sont déterminées à l'aide d'un détecteur d'indice de réfraction. L'analyse est réalisée avec le logiciel Agilent EZChrom.

Azote

L'azote résiduel est mesuré à 80% d'avancement de la fermentation. La concentration en ammonium est déterminée enzymatiquement (R- Biopharm, Darmstadt, Allemagne). La teneur du moût en acides aminés libres est déterminée par chromatographie d'échange cationique, avec dérivation post-colonne de la ninhydrine

(Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, Royaume-Uni) tel que décrit par **Crépin et al. (2012)**. L'azote consommé est obtenu avec la formule suivante :

$$N_{consommé} = N_{initial} - N_{résiduel}$$

Quantification des stérols et acides gras contenus dans les bourbes

La quantification des lipides contenus dans les bourbes des deux moûts utilisés au cours de ce stage a été réalisée par la plateforme ChemoSens (INRAE, Dijon, France). Deux cent millilitres de moût sont centrifugés pendant 10 min à 10 000 rpm pour concentrer les particules solides. Le culot est lavé trois fois avec une solution de NaCl (10mM) pour éliminer le sucre résiduel. Pour quantifier la composition lipidique des bourbes, celles-ci sont lyophilisées puis une extraction de 2h dans du méthanol/chloroforme (2:1, v/v) est réalisée. Les extraits organiques sont séchés à l'aide de Na₂SO₄ puis concentrés sur un évaporateur rotatif. Les phytostérols (campestérol, stigmastérol et β-sistostérol) ainsi que les principaux acides gras ont été quantifiés en suivant la méthode décrite par **Grison et al. (2015)** et adaptée par **Casalta et al. (2019)**. Les concentrations en stérols totaux obtenus sont présentées dans le **Tableau 2**.

Arômes fermentaires

Les échantillons prélevés en fin de fermentation sont analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard (HP) 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA) couplé à un détecteur de spectrométrie de masse HP 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA). La concentration en arômes fermentaires (alcools supérieurs, esters, acides) est mesurée à partir d'échantillons centrifugés de fin de fermentation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS). Pour cela, deux extractions sont réalisées pour chaque échantillon en ajoutant 1 mL de dichlorométhane et 10 µL de standard interne deutéré dans 5 mL d'échantillon puis en plaçant les tubes sur un table agitante pendant 20 min avant une centrifugation à 1400rpm, 4°C pendant 4 min. La phase organique est séchée par ajout de Na₂SO₄ anhydre en excès puis évaporée sous flux d'azote jusqu'à un volume final de 0,5 mL. Les composés volatils des échantillons sont vaporisés à 250°C dans l'injecteur puis transportés par l'hélium (gaz vecteur) à travers la colonne contenant de la silice (phase stationnaire). Les arômes fermentaires sont détectés en sortie de colonne par un spectromètre de masse utilisant avec impact électronique. Les spectres obtenus sont ensuite analysés en utilisant le logiciel HP G1701DA ChemStation et les arômes fermentaires sont quantifiés à l'aide d'une courbe de calibration linéaire préparée en même temps que les échantillons.

Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel R- 4.1.3 (CRAN, Vienne, Autriche ; <http://cran.r-project.org/>) en utilisant `ade4` (**Dray et Dufour, 2007**) et `nlme` (**Pinheiro et al., 2022**). Le lissage des courbes est réalisé en utilisant la fonction `locfit.h()` du package `locfit`. Une analyse par composante principale (ACP) puis une ANOVA suivie d'un test de Tukey sont réalisées.

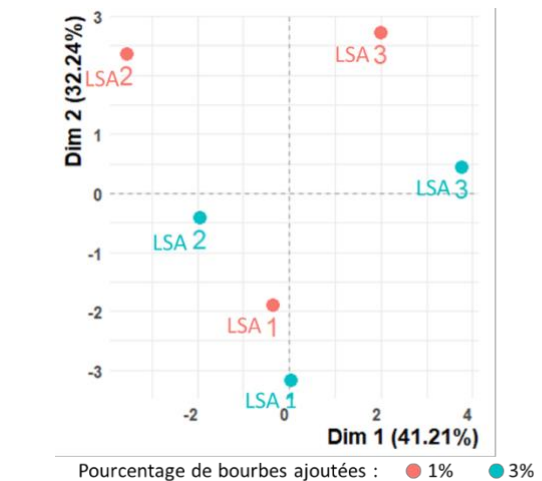
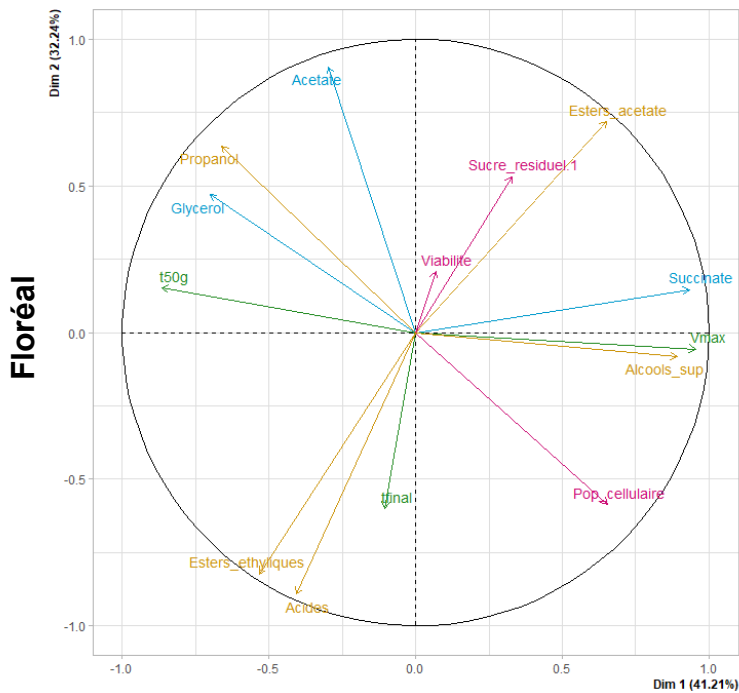
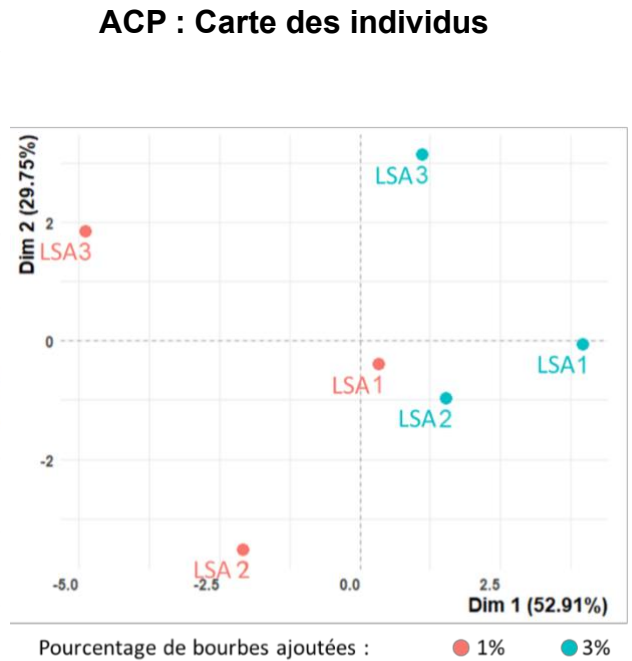
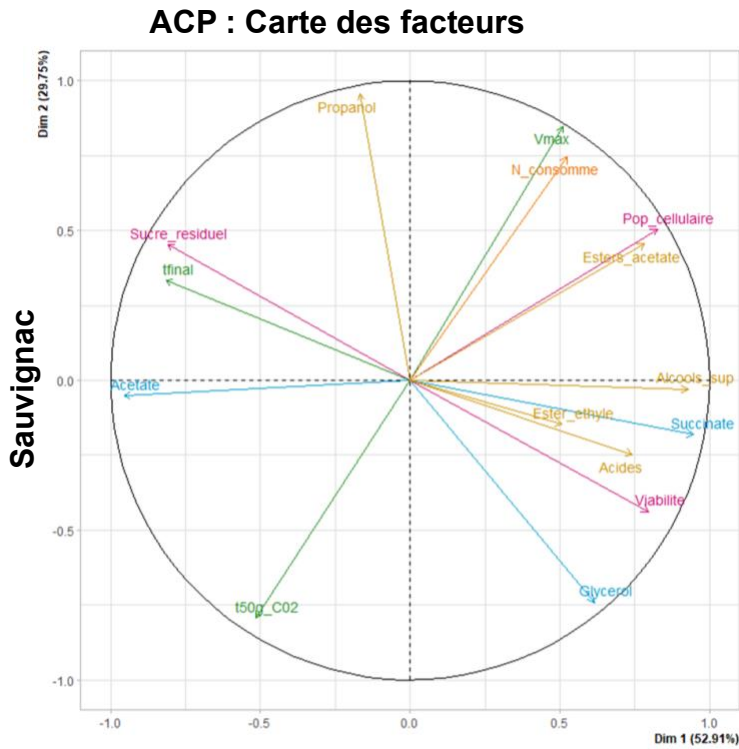


Figure 4 : Analyse en composantes principales (ACP) des paramètres cinétiques (Vitesse maximale de dégagement de CO₂ (Vmax), temps total de fermentation (tfinal), durée nécessaire pour dégager 50 g.L⁻¹ de CO₂ (t50 g_CO2), sucre résiduel, viabilité et population cellulaire (Pop_cellulaire)), des concentrations en métabolites du métabolisme carboné central (glycérol, acétate et succinate), de la consommation de l'azote assimilable (N_consommé) et des concentrations en arômes fermentaires (acides, esters éthyliques, esters d'acétates et alcools supérieurs). Sur la figure des individus, la condition avec 1% de bourbes ajoutées est représentée en bleu et celle avec 3% de bourbes ajoutées est représentée en rouge. Abréviation : LSA : Levure sèche active.

Résultats

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet du pourcentage de bourbes ajoutées sur la cinétique fermentaire, la concentration cellulaire, la consommation d'azote organique et minéral, la viabilité et la synthèse d'arômes fermentaires de trois souches de levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* sur deux moûts issus de variétés résistantes. Seul le moût issu de la variété Sauvignac sera présenté dans ce rapport car les résultats issus des fermentations réalisées sur le moût de Floréal sont en cours d'acquisition.

A. Vision globale des résultats par ACP

Trois paramètres cinétiques ont été analysés (temps nécessaire pour atteindre un dégagement de 50g.L^{-1} de CO_2 , temps total de fermentation et débit maximal de dégagement de CO_2) en relation avec la quantification des métabolites du métabolisme carboné central (glycérol, acétate, succinate), la consommation d'azote, la viabilité, la quantité de sucre résiduel et la concentration cellulaire ainsi que la concentration finale par groupes d'arômes fermentaires (propanol, autres alcools supérieurs, esters d'acétate, esters éthyliques et acides) (**Figure 4**).

Pour le Sauvignac, les deux premières composantes expliquent 82,66% de la variance totale. L'effet du niveau de bourbes ajoutées semble principalement porté par le premier axe tandis que l'effet de la souche de levure semble principalement porté par le deuxième axe. Le temps nécessaire pour atteindre 50g.L^{-1} de CO_2 dégagés est corrélé négativement à la vitesse maximale de dégagement de CO_2 (notée V_{max}) et à la quantité d'azote consommé. De plus, le temps nécessaire pour finir la fermentation n'est pas lié à la vitesse maximale de dégagement de CO_2 mais est corrélé négativement à la viabilité. La concentration finale en acétate est partiellement corrélée négativement à la viabilité et à la concentration cellulaire. Les concentrations finales en glycérol et succinate sont corrélées positivement à la viabilité mesurée. La concentration en esters d'acétate est corrélée positivement à la population cellulaire tandis que les concentrations finales en alcools supérieurs, acides et esters éthyliques sont liées à la viabilité et à la production de succinate.

Pour les trois souches de levure, l'ajout de bourbes provoque un déplacement vers la droite en suivant majoritairement le premier axe sauf pour LSA2 qui présente un effet du

Tableau 3 : Effets du niveau de bourbes ajoutées et de la souche de levure sur les différents paramètres fermentaires.

Sauvignac	Bourbes ajoutées	Souche de Levure	Interaction Bourbes - Souche
Dénombrement cellulaire	+	X	NS
Vitesse maximale de dégagement de CO ₂	+	NS	NS
Viabilité	+	X	NS
Temps pour 50g.L ⁻¹ de CO ₂	-	NS	NS
Temps total de fermentation	-	X	X
Acétate	-	X	NS
Succinate	+	NS	NS
Glycérol	NS	X	NS
Azote consommé	+	NS	NS
Sucre consommé	+	X	X
Propanol	NS	X	NS
Alcools supérieurs	+	X	NS
Acides	+	X	X
Esters d'acétate	+	NS	X
Esters éthyliques	+	X	X

Floréal	Bourbes ajoutées	Souche de Levure	Interaction Bourbes - Souche
Dénombrement cellulaire	+	NS	NS
Débit de dégagement de CO ₂ maximal	NS	NS	NS
Viabilité	+	X	NS
Temps pour 50g.L ⁻¹ de CO ₂	NS	NS	NS
Temps total de fermentation	NS	X	NS
Acétate	-	X	NS
Succinate	NS	X	NS
Glycérol	NS	NS	NS
Azote consommé	?	?	?
Sucre consommé	+	X	X
Propanol	-	NS	X
Alcools supérieur	+	X	NS
Acides	+	X	NS
Esters d'acétate	NS	X	NS
Esters éthyliques	+	X	NS

Rouge : $p < 0,001$, orange : $p < 0,01$, jaune : $p < 0,05$, NS : non significatif, (+) : effet positif, (-) : effet négatif, (x) : existence d'un effet, (?) en attente de l'obtention du résultat. Les p -values sont obtenues par ANOVA.

deuxième axe. Ce résultat semble indiquer que l'effet des bourbes est relativement identique pour les trois souches.

Pour le Floréal, les deux premières composantes expliquent 76,84% de la variance totale. Contrairement aux fermentations en moût Sauvignac, l'effet de la souche de levure semble principalement porté par le premier axe tandis que l'effet des bourbes semble principalement porté par le deuxième axe. De même que pour le Sauvignac, le temps nécessaire pour atteindre 50g.L⁻¹ de CO₂ dégagés est corrélé négativement à la vitesse maximale de dégagement de CO₂ et à la quantité d'azote consommé. De plus, le temps nécessaire pour finir la fermentation n'est pas lié à la vitesse maximale de dégagement de CO₂ mais est corrélé négativement à la viabilité. À l'inverse des fermentations en moût Sauvignac, la concentration finale en acétate est partiellement corrélée positivement à la viabilité.

Pour les trois souches de levures, l'ajout de bourbes provoque un déplacement vers le bas et plus faiblement vers la droite.

B. Vision détaillée

Les résultats présentés ci-dessous ont été analysés à l'aide d'un test de Tukey permettant d'évaluer si les paramètres présentent un effet significatif.

Cinétique de fermentation

La durée totale de fermentation varie en fonction de la quantité de bourbes ajoutées et de la levure utilisée mais aussi de l'interaction entre ces deux paramètres (**Tableau 3 ; Figure 5**). Les fermentations les plus rapides en moût Sauvignac correspondent à LSA1 et 2 et 3 avec 3% de bourbes ajoutées et durent environ 261h soit environ 11jours tandis que la fermentation la plus longue correspond à LSA3 1% avec une durée de 594h soit environ 25 jours. En moût Floréal, les fermentations les plus rapides sont obtenues pour LSA2 et 3 avec 3% de bourbes ajoutées et durent environ 265h. La fermentation la plus longue en moût Floréal dure 473h et correspond à LSA1 avec 1% de bourbes ajoutées. L'augmentation du niveau de bourbes permet de réduire le temps total de fermentation.

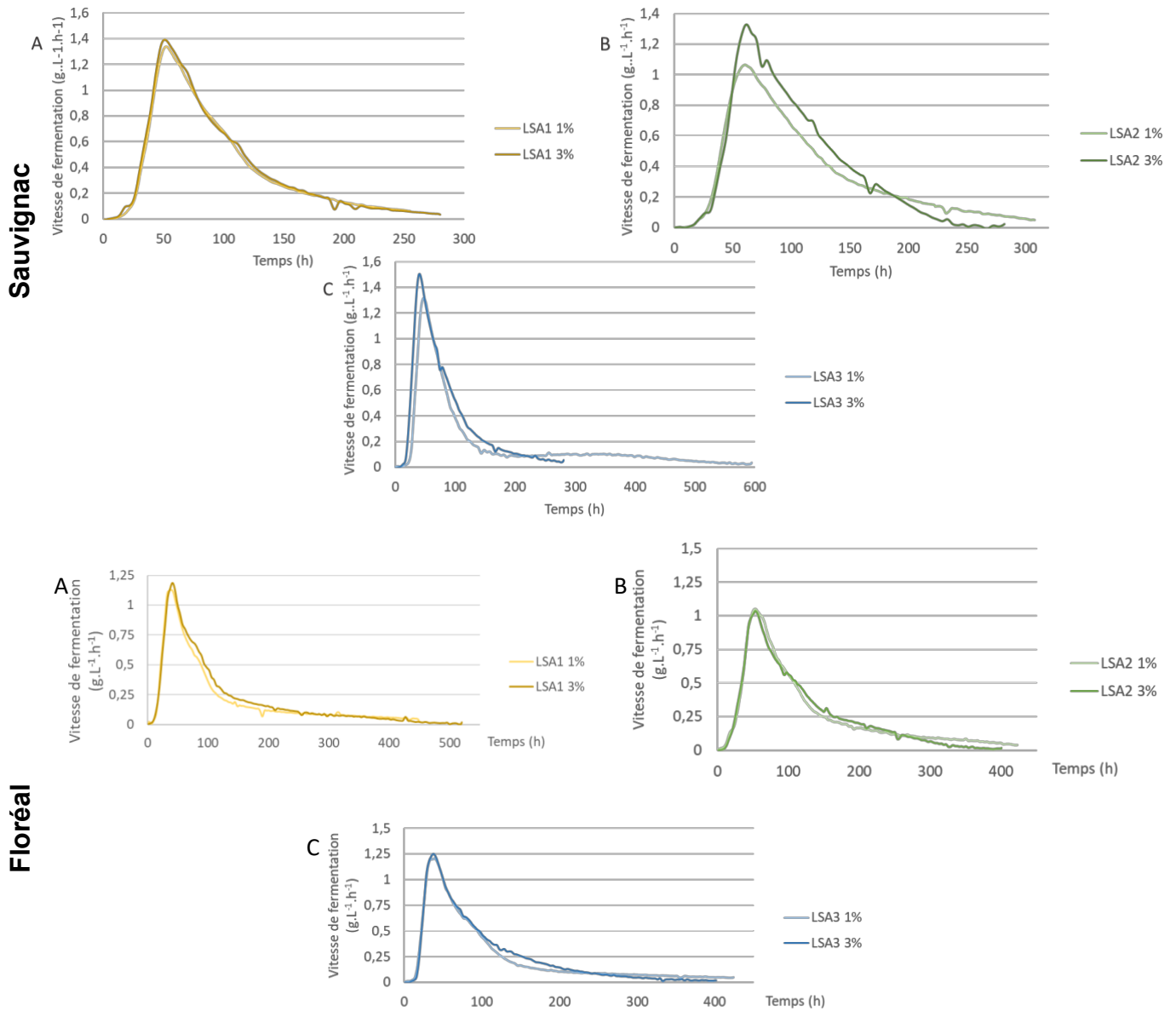


Figure 5 : Evolution de la cinétique fermentaire (dCO_2/dt) des trois souches de levures (A) LSA1, (B) LSA2, (C) LSA3 avec 1% ou 3% (v/v) de bourbes ajoutées (n=3). Les courbes représentées correspondent à la moyenne des trois réplicats. Abréviations : LSA : Levure sèche active.

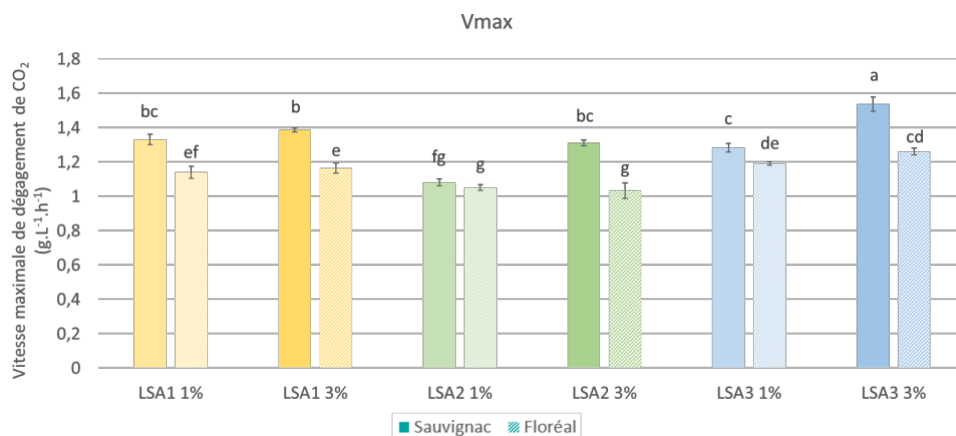


Figure 6 : Vitesses maximales de dégagement de CO₂ pour trois souches de levures et deux niveaux de bourbes ajoutées (1% et 3%, v/v). Les valeurs présentées sont les moyennes des trois réplicats. Des lettres différentes représentent une différence significative entre les valeurs. Abréviations : LSA : Levure sèche active.

Vitesse maximale de dégagement de CO₂

Le débit maximal de CO₂ dépend du pourcentage de bourbes ajoutées (**Tableau 3 ; Figure 6**). La vitesse maximale de dégagement de CO₂ en moût Sauvignac correspond à la condition LSA3 avec 3% de bourbes ajoutées et est égale à 1,54 g de CO₂.L⁻¹.h⁻¹. La souche LSA1 ne présente pas de différence significative pour la Vmax en fonction du niveau de bourbes ajoutées (1,33 et 1,39 g de CO₂.L⁻¹.h⁻¹ pour 1% et 3% de bourbes, respectivement). La vitesse maximale atteinte par LSA2 avec 3% de bourbes est similaire à celle atteinte par LSA3 avec 1% de bourbes (1,31 g et 1,28 g de CO₂.L⁻¹.h⁻¹, respectivement). La valeur la plus faible est obtenue par LSA2 avec 1% de bourbes ajoutées (1,08 g de CO₂.L⁻¹.h⁻¹). A l'exception de LSA2 avec 1% de bourbes en moût Sauvignac, toutes les valeurs de vitesses de dégagement de CO₂ obtenues en moût Floréal sont inférieures à celles obtenues en moût Sauvignac. En moût Floréal, le débit maximal de dégagement de CO₂ est de 1,26 pour LSA3 avec 3% de bourbes ajoutées. A nouveau, la valeur la plus faible correspond à LSA2 (1,04 g de CO₂.L⁻¹.h⁻¹).

Consommation de sucre

La consommation du sucre dépend du niveau de bourbes ajoutées, de la levure utilisée et de l'interaction entre ces deux paramètres (**Tableau 3**). Lorsque la quantité de bourbes augmente, la consommation de sucre augmente (**Figure 7**). en moût Sauvignac, la différence la plus importante correspond à LSA3 (49,93 g.L⁻¹ de sucre résiduel pour 1% de bourbes et 11,83 g.L⁻¹ pour 3%). En moût Floréal, seules LSA1 et 3 avec 1% de bourbes ajoutées présentent des valeurs supérieures à 5 g.L⁻¹ de sucre résiduel (6,69 et 18,06 g.L⁻¹ de sucre résiduel, respectivement).

Viabilité

Pour les trois souches, la viabilité augmente lorsque l'ajout de bourbes est plus important (**Tableau 3 ; Figure 8**). Par exemple, en moût Sauvignac, pour LSA2, elle atteint 62,7% pour 1% de bourbes ajoutées et 88,30% pour 3% de bourbes ajoutées. Il est important de noter que, pour LSA3 avec 1% de bourbes ajoutées, la viabilité est très faible (7,31%). En moût Floréal, la viabilité la plus faible correspond à LSA1 avec 1% de bourbes ajoutées et elle est de 20%.

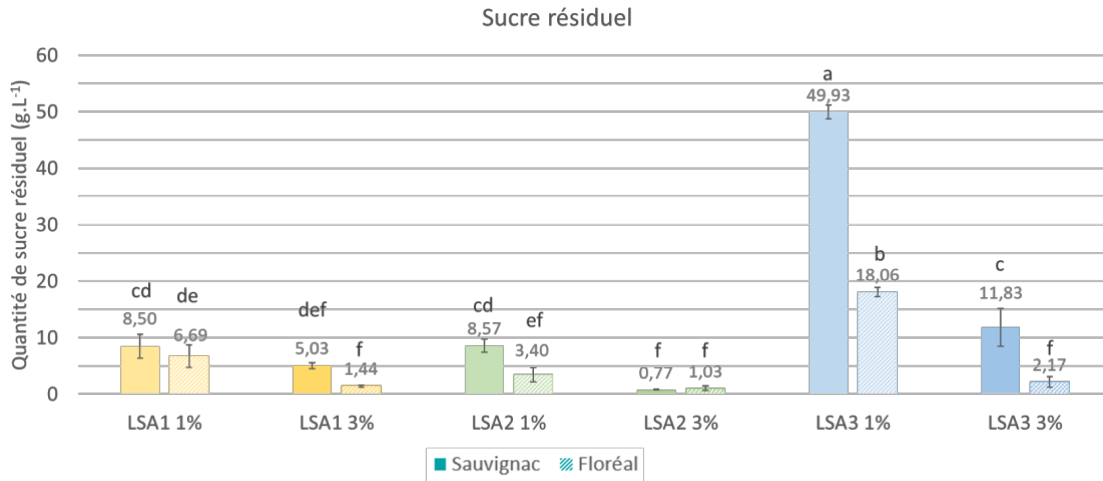


Figure 7 : Quantité de sucre résiduel mesuré en fin de fermentation pour trois souches de levures et deux niveaux de bourbes ajoutées (1% et 3%, v/v). Les valeurs présentées sont les moyennes des trois réplicats. Des lettres différentes représentent une différence significative entre les valeurs.

Abréviation : LSA : Levure sèche active.

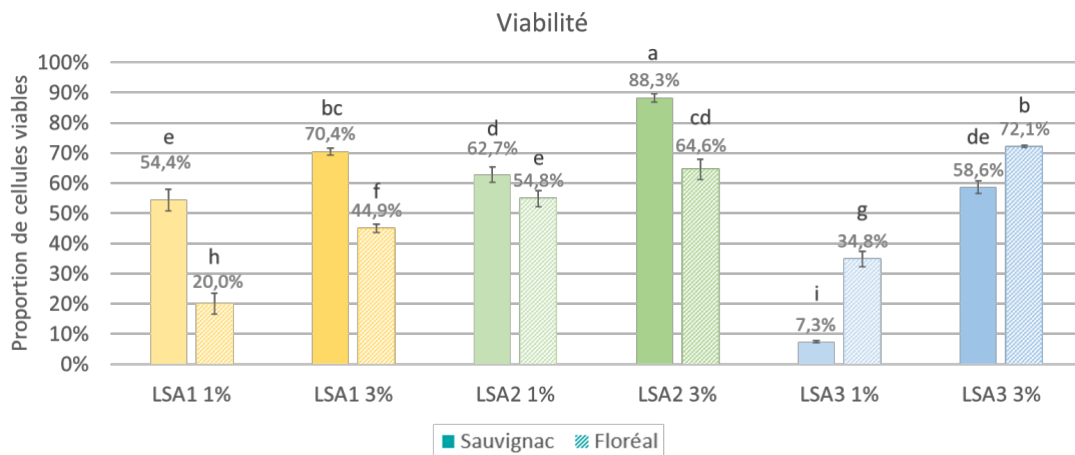


Figure 8 : Viabilité des levures mesurée par cytométrie en flux à 80% d'avancement de la fermentation pour trois souches de levures et deux niveaux de bourbes ajoutées (1% et 3%, v/v). Les valeurs présentées sont les moyennes des trois réplicats. Des lettres différentes représentent une différence significative entre les valeurs.

Abréviation : LSA : Levure sèche active.

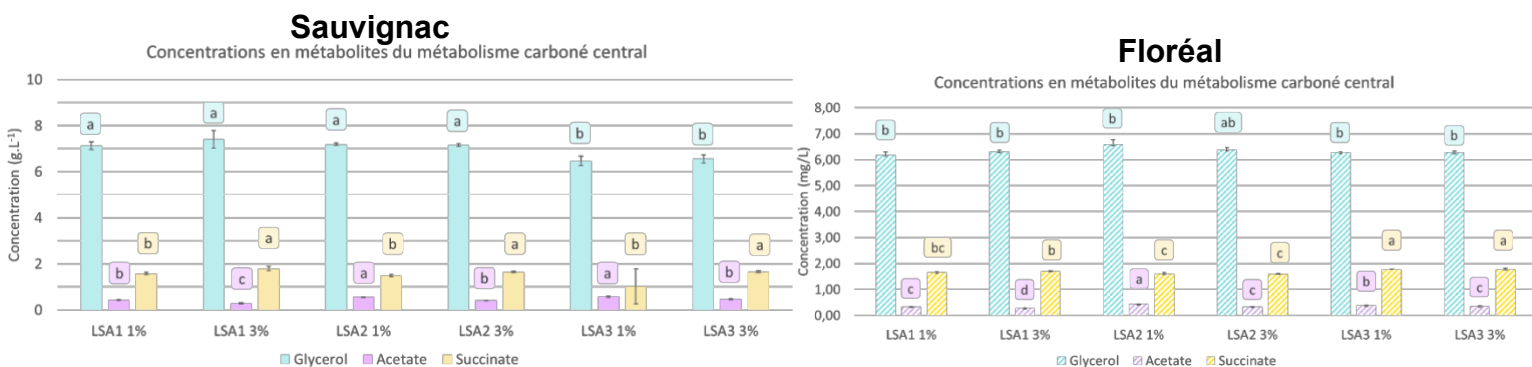


Figure 9 : Concentrations finales en métabolites du métabolisme carboné central pour trois souches de levures et deux niveaux de bourbes ajoutées (1% et 3%, v/v). Les valeurs présentées sont les moyennes des trois réplicats. Des lettres différentes représentent une différence significative entre les valeurs.

Abréviation : LSA : Levure sèche active.

Population cellulaire

La population cellulaire dépend du niveau d'ajout de bourbes et de la levure utilisée (**Tableau 3**). En moût Sauvignac, LSA1 ne présente pas de différence significative entre 1% (144.10^6 cellules.mL⁻¹) et 3% (157.10^6 cellules.mL⁻¹) de bourbes ajoutées pour la concentration cellulaire mesurée à 80% d'avancement de la fermentation. La plus faible concentration cellulaire est obtenue avec LSA2 avec 1% de bourbes ajoutées et correspond à $97,8.10^6$ cellules.mL⁻¹ tandis qu'elle atteint 136.10^6 cellules.mL⁻¹ en ajoutant plus de bourbes. Pour LSA3, la population cellulaire passe de 113.10^6 cellules.mL⁻¹ à 151.10^6 cellules.mL⁻¹ lorsque qu'une plus grande quantité de bourbes est ajoutée. En moût Floréal, les trois souches de levures présentent une augmentation significative de la concentration cellulaire lorsque plus de bourbes sont ajoutées. Pour LSA1, la population passe de 115.10^6 cellules.mL⁻¹ à 137.10^6 cellules.mL⁻¹ en augmentant la quantité de bourbes ajoutées. LSA2 est à nouveau la souche avec la population cellulaire la moins importante avec $92,3.10^6$ cellules.mL⁻¹ pour 1% de bourbes ajoutées et 124.10^6 cellules.mL⁻¹ pour 3% de bourbes ajoutées. Pour LSA3, la population cellulaire est de 110.10^6 cellules.mL⁻¹ pour 1% de bourbes ajoutées et de 144.10^6 cellules.mL⁻¹ pour 3% de bourbes ajoutées. Seule LSA1 présente une population significativement plus élevée en moût Sauvignac par rapport au Floréal.

Consommation de l'azote

La consommation d'azote la plus importante en moût Sauvignac est observée lorsque 3% de bourbes sont ajoutés au moût inoculé avec LSA3 et correspond à 211,79 mg.L⁻¹ consommés sur les 220 mg.L⁻¹ contenus initialement dans le moût de Sauvignac. La totalité de l'azote ammoniacal est consommée par les trois souches utilisées pour les deux niveaux de bourbes ajoutées. Pour LSA1 et 2, la consommation augmente aussi lorsque le pourcentage de bourbes ajouté augmente (**Tableau 3**). Si la quantité de bourbes ajoutées augmente, la consommation d'azote passe de 184,71 à 206,37 mg.L⁻¹ pour LSA1 et de 159,71 à 206,08 mg.L⁻¹ pour LSA2. Pour LSA3 avec 1% de bourbes ajoutées, 193,77 mg.L⁻¹ d'azote sont consommés. En moût Floréal, l'azote ammoniacal est aussi complètement consommé mais il n'a pas encore été possible de quantifier la consommation des acides aminés par les levures à cause d'une panne de l'appareil de mesure.

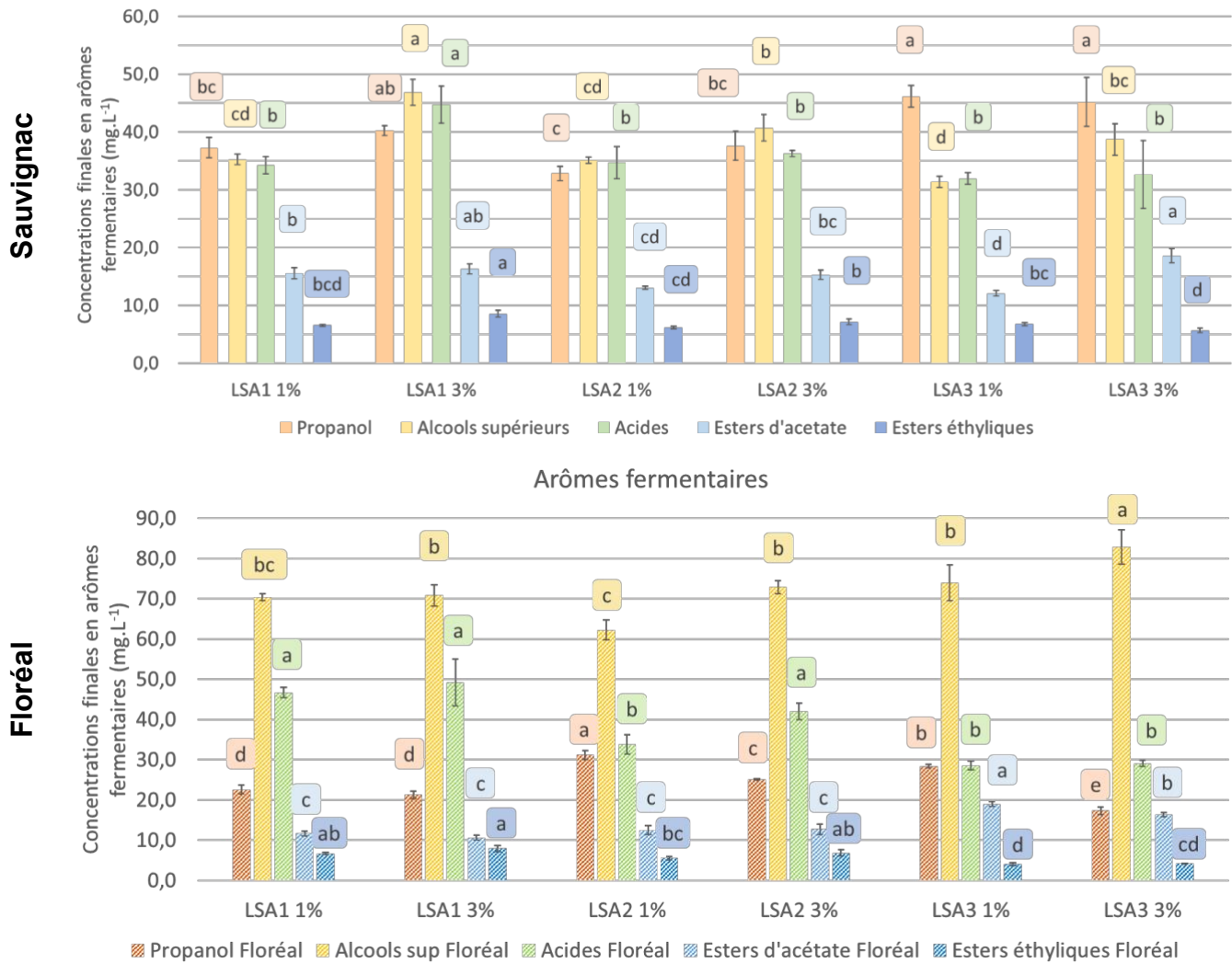


Figure 10 : Concentrations finales en arômes fermentaires pour trois souches de levures et deux niveaux de bourbes ajoutées (1% et 3%, v/v). Les valeurs présentées sont les moyennes des trois réplicats. Des lettres différentes représentent une différence significative entre les valeurs. Abréviation : LSA : Levure sèche active.

Métabolites du métabolisme carboné central

La concentration finale en glycérol dépend seulement de la souche avec une concentration plus faible pour LSA3 que pour LSA1 et 2 (**Tableau 3 ; Figure 9**) en moût Sauvignac. En moût Floréal, il n'y a pas de différence significative pour la synthèse de glycérol.

En moût Sauvignac, la concentration en acétate en fin de fermentation dépend à la fois de la levure utilisée et du volume de bourbes ajoutées (**Tableau 3 ; Figure 9**). Les concentrations les plus importantes en acétate correspondent aux conditions LSA2 et LSA3 avec 1% de bourbes ajoutées. La concentration la plus faible en acétate est de 0,29 g.L⁻¹ et correspond à LSA1 avec 3% de bourbes ajoutées. LSA1 présente une concentration finale en acétate plus faible que LSA2 et 3. De même pour les fermentations réalisées en moût Floréal, LSA2 et 3 produisent une quantité plus importante d'acétate que LSA1 et sa concentration finale dépend bien de la levure utilisée et de la concentration en bourbes.

Pour le succinate, en moût Sauvignac, la concentration finale est liée au volume de bourbes ajoutées (**Tableau 3 ; Figure 9**) et augmente lorsque le pourcentage de bourbes ajoutées augmente. En moût Floréal, la concentration finale en acétate dépend de la quantité de bourbes et de la souche de levure. LSA3 présente la concentration la plus élevée et LSA2 la plus faible.

Arômes fermentaires

À l'exception du propanol qui est un marqueur métabolique important, les résultats présentés ci-dessous sont des sommes de molécules regroupées par famille chimique.

Propanol

La concentration finale en propanol dépend uniquement de la souche de levure utilisée et pas du niveau de bourbes ajoutées pour le moût Sauvignac. Les concentrations les plus importantes sont obtenues pour LSA3 (**Tableau 3 ; Figure 10**). En moût Floréal, seule LSA1 ne présente pas de différence significative de la concentration en propanol en fonction de la quantité de bourbes ajoutées. Pour LSA2 et 3, une diminution de la synthèse en propanol est observée lorsque la concentration en bourbes augmente. Pour ce moût, il existe un effet de la quantité de bourbes ajoutées et de l'interaction entre le niveau de bourbes et la souche de levure utilisée.

Alcools supérieurs

La concentration finale en alcools supérieurs augmente avec le niveau de bourbes ajoutées ; elle est également impactée par la levure utilisée (**Tableau 3 ; Figure 10**). En moût Sauvignac, la concentration la plus élevée correspond à LSA1 avec 3% de bourbes ajoutées et elle est de 46,9 mg.L⁻¹. En moût Floréal, LSA1 ne présente pas de différence significative pour la synthèse des alcools supérieurs tandis que LSA2 et 3 présentent une augmentation lorsque la quantité de bourbes ajoutées augmente. La concentration la plus importante correspond à LSA3 avec 3% de bourbes ajoutées et elle est de 82,8 mg.L⁻¹.

Acides

En moût Sauvignac, la concentration finale en acides dépend du niveau de bourbes ajoutées, de la souche de levure utilisée et de l'interaction entre ces deux paramètres (**Tableau 3 ; Figure 10**). La concentration augmente avec l'ajout de bourbes uniquement pour LSA1, même si une tendance à la hausse est aussi observée pour les deux autres souches. La concentration la plus élevée correspond à LSA1 avec 3% de bourbes ajoutées. En moût Floréal, l'augmentation de la quantité de bourbes permet une augmentation de la synthèse d'acides. L'effet de la souche utilisée est aussi important puisque seule LSA2 présente une augmentation significative de la synthèse d'acides.

Esters d'acétate

Pour le groupe des esters d'acétate, en moût Sauvignac, la concentration finale dépend du niveau de bourbes ajoutées et de l'interaction entre le niveau de bourbes et la levure utilisée (**Tableau 3 ; Figure 10**). Lorsque le pourcentage de bourbes ajoutées augmente, les concentrations en esters d'acétates augmentent, principalement pour LSA3 qui est la seule pour laquelle la différence est significative. En moût Floréal, seule la souche de levure a un effet sur la synthèse des esters d'acétate.

Esters éthyliques

En moût Sauvignac, les concentrations finales en esters éthyliques dépendent du niveau de bourbes ajoutées, de la levure utilisée et de l'interaction entre le niveau de bourbes et la levure utilisée (**Tableau 3 ; Figure 10**). Lorsque le pourcentage de bourbes utilisées augmente, la concentration finale en esters éthyliques augmente, sauf pour LSA3 pour laquelle moins d'esters éthyliques sont synthétisés au cours de la fermentation, ce qui indique un effet important de l'interaction. En moût Floréal, seuls le niveau de bourbes ajoutées et la souche de levure utilisée ont un effet sur la concentration finale en esters

éthyliques. Pour les fermentations réalisées en moût Floréal, LSA3 produit moins d'esters éthyliques.

Discussion

A. Effets du niveau d'ajout de bourbes

Tout d'abord, en moût Sauvignac, pour les trois souches évaluées dans ce travail, une présence d'azote résiduel est notée à la fin des fermentations à 1% de bourbes ajoutées. Cette observation indique que l'ajustement du pourcentage de bourbes à une valeur couramment utilisée dans la filière œnologique ne permet pas de se placer dans une situation où le nutriment limitant est l'azote. Dans ces conditions, la fermentation est languissante pour les souches LSA1 et LSA2, et bloquée pour LSA3 (49,9 g.L⁻¹ de sucre résiduel final pour LSA3 avec 1% de bourbes ajoutées contre 8,5 et 8,6 g.L⁻¹ pour LSA1 et 2), à cause de viabilités faibles (entre 7,31 et 62,7% à 1% pour les 3 souches). En moût Floréal, les fermentations sont languissantes pour les trois souches malgré des quantités plus faibles de sucre résiduel (18,06 g.L⁻¹ pour LSA3 avec 1% de bourbes ajoutées, 6, 69 g.L⁻¹ pour LSA1 et 3,40 g.L⁻¹ pour LSA2). A nouveau, les viabilités sont plutôt faibles (entre 20,0 et 54,8% à 1% de bourbes ajoutées). Cette situation semble liée à la faible teneur des moûts Sauvignac et Floréal en stérols (1,132 mg.L⁻¹ et 0,851 mg.L⁻¹ à 1% de bourbes ajoutées, **Tableau 2**). En effet, même si la quantité de stérols nécessaires pour achever la fermentation varie en fonction de la souche de levure utilisée, cette valeur se situe généralement entre 2 et 8 mg.L⁻¹ (**Girardi Piva et al., 2022**). Pour ces variétés de raisin, il semble donc important d'apporter une attention particulière à la valeur initiale du pourcentage de bourbes pour avoir une fermentation complète (sans sucre résiduel).

Dans un second temps, l'impact de l'ajout de bourbes sera détaillé. Tout d'abord, il apparaît que, lorsque la concentration en lipides dans le moût augmente grâce à l'ajout plus important de bourbes, la population cellulaire augmente, ce qui est cohérent avec la meilleure assimilation de l'azote lorsque 3% de bourbes sont ajoutés. Ces résultats confirment ceux de **Casalta et al. (2013)**. **Ochando et al. (2017)** ont montré que l'augmentation de la concentration en stérols dans le milieu initial favorise la consommation de l'azote tandis que **Crépin et al. (2012)** avaient déjà observé une augmentation de la population cellulaire lorsque la concentration initiale en azote est plus élevée. L'augmentation de la vitesse maximale de dégagement de CO₂ en moût Sauvignac (**Figure 6**) correspond à cette augmentation de la population cellulaire..

Pour les fermentations réalisées en moût Sauvignac, le temps nécessaire pour atteindre 50 g.L⁻¹ de CO₂ (qui correspond environ à la moitié de l'avancement de réaction) diminue aussi lorsque la population augmente. Cette observation est tout à fait cohérente avec le fait qu'au début du procédé, la vitesse de dégagement de CO₂ (et en particulier le V_{max}) est plus importante. Pour les fermentations réalisées en moût Floréal, les différences de V_{max} et pour atteindre 50 g.L⁻¹ de CO₂ ne sont pas significatives alors que la population augmente, l'activité spécifique des cellules de levures pourrait alors varier en fonction d'autres paramètres qui restent à étudier.

Par contre, il est important de noter que la durée totale de fermentation et la consommation de sucre ne sont pas corrélées à la population cellulaire comme c'est le cas pour les fermentations dont l'azote est le nutriment limitant (**Bell et Henschke, 2005**) mais plutôt à la viabilité (**Figure 4**). En effet, pour LSA3 avec 1% de bourbes en moût Sauvignac, la viabilité étant de 7,31%, il reste trop peu de levures viables à 80% d'avancement de la fermentation pour que celle-ci puisse finir (consommation de la totalité du sucre). Cette mortalité importante peut s'expliquer par les conditions de fermentation particulièrement difficiles. Tout d'abord, en absence d'oxygène, *S. cerevisiae* ne peut pas synthétiser l'ergostérol et l'intégrer à sa membrane plasmique, ce qui permettrait une meilleure résistance au stress causé par la concentration importante en éthanol en fin de fermentation (**Tesnière, 2019**). En effet, les stérols ont pour rôle principal de réguler la fluidité de la membrane ainsi que sa perméabilité et son épaisseur. De plus, à 1% de bourbes, la concentration en phytostérols n'est pas suffisante pour permettre leur parfaite intégration dans la membrane et donc une bonne résistance à la toxicité due à l'éthanol. **Girardi Piva et al. (2022)** ont noté que, si la carence en stérols est trop importante, la voie de synthèse de l'ergostérol est initiée mais ne peut pas être complétée. Cette situation provoque une accumulation dans la membrane plasmique de squalène, un précurseur de l'ergostérol avec pour conséquence une chute de la viabilité et une forte augmentation du temps de fermentation (**Girardi Piva et al., 2022**). Pour les fermentations en moût Floréal, c'est LSA1 qui présente la viabilité la plus faible (20,0%), il est alors possible de dire qu'il existe une interaction entre la souche de levure et le moût utilisé. Surprenamment, malgré la viabilité plus faible de LSA1 par rapport à LSA2 en moût Floréal, LSA2 reste la souche avec la plus grande quantité de sucre résiduel. Cela pourrait s'expliquer par une baisse plus importante de la viabilité de cette souche après la mesure réalisée à 80% d'avancement, ou par une différence de vitalité des cellules. C'est-à-dire que même si le nombre de cellules viables est important, si l'activité métabolique des

cellules est faible, la fermentation pourra être languissante ou bloquée. L'indice de vitalité peut-être calculé par le rapport :
$$Vitalite = \frac{Vitessedefermentation}{Nombredecellulesviabiles} \times 10^9$$

En conditions de lipides limitants et d'anaérobiose, une hausse significative de la production d'acétate est observée (**Tableau 3 ; Figure 10**). Cette synthèse plus importante est liée au fait qu'une carence en stérols modifie le métabolisme de la levure en stimulant la synthèse de lipides, causant une accumulation d'acétate et de NADPH. En effet, plus de pyruvate est dirigé vers la voie cytosolique de synthèse d'acétyl-CoA dont l'acétate est un intermédiaire (**Figure 1 ; Girardi Piva et al., 2022**).

Le déséquilibre entre les concentrations initiales d'azote et de lipides dans le moût (à l'origine de la carence en lipides) peut aussi provoquer une conversion plus importante de l' α -cétoglutarate en glutamate puis en acides aminés et ainsi limiter la synthèse du succinate qui est le produit final du cycle de Krebs en conditions fermentaires (**Figure 1 ; Girardi Piva et al., 2022**).

Enfin, il est aussi intéressant de remarquer que lorsque le niveau de bourbes ajoutées est faible, les concentrations finales en alcool supérieurs, esters d'acétates, acides et esters d'éthyles sont plus faibles (**Figure 10**). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'acétyl-CoA est un intermédiaire de l'ensemble des voies de synthèses de ces arômes fermentaires (**Figure 2**). En carence en lipides, cette molécule est principalement convertie en acétate qui est excrété dans le milieu extracellulaire et est donc moins disponible pour la synthèse des arômes fermentaires.

B. Effets de la souche de levure utilisée

L'effet de l'utilisation de différentes souches de levures sur les paramètres fermentaires, les métabolites du métabolisme carboné central et la synthèse d'arôme est déjà connu et exploité pour obtenir des vins avec un caractère particulier. L'étude des trois souches utilisées ici a pour objectif de mieux comprendre leurs comportements fermentaires.

En effet, le choix de la souche de levure utilisée présente un impact important sur la viabilité et la consommation du sucre initialement contenu dans le moût (**Figure 7**). En moût Sauvignac, LSA3 avec 1% de bourbes ajoutées présente une viabilité très faible

(7,31%) et une quantité de sucre résiduel très élevée (49,93 g.L⁻¹) alors que pour ce même taux de bourbes, LSA1 et 2 présentent des viabilités nettement plus élevées (54,4 et 62,7%, respectivement) et des teneurs en sucre résiduel significativement réduites (8,50 et 8,57 g.L⁻¹, respectivement). Pour les deux moûts utilisés, LSA2 est la souche qui présente la meilleure viabilité et la plus faible quantité de sucre résiduel (**Figure 7**).

Pour les fermentations en moût Sauvignac, les variations de concentration finale en glycérol sont uniquement dues à la souche de levure utilisée (**Tableau 3 ; Figure 9**). Le glycérol permet à la levure de mieux résister au stress osmotique causé par la concentration importante en sucre au début de la fermentation en jouant le rôle d'osmolyte (**Taherzadeh et al., 2002**). La synthèse du glycérol au cours de la fermentation permet aussi l'oxydation du NADH produit en excès au cours de la production de biomasse (**Seguinot, 2019**). Il est aussi un intermédiaire de la voie de biosynthèse des triglycérides (**Zheng et Zou, 2001**) qui sont des constituants essentiels de la membrane cellulaire. Ainsi, il semble que la synthèse de glycérol soit liée à une viabilité plus élevée. Cela pourrait expliquer pourquoi LSA3 est la souche produisant le moins de glycérol.

L'acétate final dépend aussi de la souche de levure utilisée (**Tableau 3 ; Figure 9**). Cela montre que ces trois souches ne présentent pas une réponse identique face au stress causé par la carence en lipide. LSA3 est la souche qui présente la plus forte concentration en acétate et présente la plus forte mortalité en moût Sauvignac (**Figures 8 et 9**), ce qui est cohérent avec l'ACP (**Figure 4**). De façon plus surprenante, en moût Floréal, c'est LSA2 qui présente la concentration la plus élevée en acétate alors que la viabilité la plus faible correspond à LSA1.

En moût Sauvignac, le propanol est un marqueur cellulaire de la concentration en azote assimilable et dont la synthèse ne dépend pas de la concentration en lipides dans le moût (**Figure 4 ; Tableau 3**). Le fait que la production de ce composé ne dépende que de la souche utilisée et pas du niveau de bourbes semble indiquer que 1/ la gestion de l'azote varie en fonction de la souche utilisée et que 2/ la consommation plus importante d'azote suite à la hausse du pourcentage de bourbes n'est pas suffisante pour induire une augmentation significative de la synthèse de propanol. En moût Floréal, la synthèse de propanol dépend de la quantité de bourbes ajoutées et de l'interaction entre le niveau de bourbes et la souche utilisée, cela confirme aussi l'existence d'une interaction entre la souche et le moût utilisé.

C. Effets de l'interaction entre le niveau d'ajout de bourbes et la souche de levure utilisée

En plus de l'effet du niveau de bourbes et de celui de la levure, il peut exister une interaction entre ces deux paramètres. Cet effet est principalement visible au niveau de la cinétique fermentaire et de la consommation de sucre. En effet, pour LSA3, la durée de fermentation est divisée par deux lorsque le taux de bourbes passe de 1 à 3% alors que la diminution de temps est beaucoup plus faible pour les deux autres souches. Cette observation est également valable pour le sucre résiduel ; une différence beaucoup plus importante est observée pour LSA3 lorsque le taux de bourbes passe de 1 à 3%.

L'ajout de bourbes provoque une augmentation significative de la synthèse d'acides uniquement pour LSA1 en moût Sauvignac, même si une tendance à la hausse est aussi observée pour les deux autres souches.

Une interaction est aussi observée pour les esters d'acétate puisque seule LSA3 en moût Sauvignac est impactée par le changement du niveau de bourbes ajoutées.

Enfin, pour LSA1 et LSA2 en moût Sauvignac, l'augmentation du niveau de bourbes augmente la concentration en esters éthyliques tandis qu'une baisse significative est observée pour LSA3 (**Figure 10**).

Ces résultats confirment l'effet concerté des bourbes et des souches et donc l'importance de ne pas dissocier ces deux paramètres.

D. Effets du moût de raisin utilisé

Des différences ont été observées sur les paramètres mesurés en fonction du moût utilisé : Sauvignac ou Floréal.

Par exemple, la durée totale de fermentation est plus faible en moût Floréal et la consommation de sucre plus importante mais la synthèse d'arômes fermentaire dépend du moût en fonction des familles chimiques.

Conclusion

Ce stage a porté sur l'étude des effets de la variation de la quantité de bourbes ajoutées en association avec trois souches de levures sélectionnées par l'entreprise Lallemand. L'objectif était d'optimiser le potentiel fermentaire de chacune des deux variétés de raisin. Les données collectées ont permis de confirmer le rôle clé des bourbes déjà identifié dans les travaux précédents, à la fois sur la cinétique fermentaire mais aussi sur les arômes fermentaires. Il apparaît que la viabilité des levures est le paramètre déterminant puisqu'elle est directement corrélée avec la durée de fermentation et la teneur finale en sucre. Sur moût de Sauvignac, il est possible de constater que la viabilité des levures utilisées au cours de ce stage est particulièrement faible, même à 3% de bourbes ajoutées. En particulier, la troisième souche de levure (LSA3) présente une viabilité très faible lorsque la carence en lipides est importante (1% de bourbes ajoutées) et que le moût issu de raisin Sauvignac est utilisé. La gestion de la turbidité semble donc être un paramètre majeur à contrôler pour cette nouvelle variété de raisin résistant.

Afin de compléter ce travail, il serait intéressant d'étudier les potentiels œnologiques d'autres variétés résistantes ainsi que les comportements fermentaires d'autres souches de levures avec différents niveaux d'ajouts de bourbes pour évaluer si la nutrition lipidique est vraiment un enjeu clé dans la vinification de ces nouvelles variétés de raisin.

Bibliographie

- Bell, S.-J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990). Description of Alcoholic Fermentation Kinetics : Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 319-324.
- Casalta, E., Cervi, M. F., Salmon, J. M., & Sablayrolles, J. M. (2013). White wine fermentation : Interaction of assimilable nitrogen and grape solids: Interaction of assimilable nitrogen and grape solids on alcoholic fermentation under oenological conditions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1), 47-52. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00205.x>
- Casalta, E., Salmon, J.-M., Picou, C., & Sablayrolles, J.-M. (2019). Grape Solids : Lipid Composition and Role during Alcoholic Fermentation under Enological Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 70(2), 147-154. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.18049>
- Casalta, E., Vernhet, A., Sablayrolles, J.-M., Tesniere, C., & Salmon, J.-M. (2016). Review : Characterization and Role of Grape Solids during Alcoholic Fermentation under Enological Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(2), 133-138. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15060>
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., & Camarasa, C. (2012). Sequential Use of Nitrogen Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation : A Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 8102-8111. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>
- Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 Package : Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4). <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. (2014). The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2), p91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n2p91>
- Fleet, G. H. (Éd.). (2002). *Wine : Microbiology and biotechnology*. Taylor & Francis. ISBN : 978-0-415-27850-8.
- Fraenkel, D. G. (1986). Mutants in glucose metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 317-337. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.001533>
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., & Milgroom, M. G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) : A fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology*, 13(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x>
- Girardi Piva, G., Casalta, E., Legras, J.-L., Tesnière, C., Sablayrolles, J.-M., Ferreira, D., Ortiz-Julien, A., Galeote, V., & Mouret, J.-R. (2022). Characterization and Role of Sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during White Wine Alcoholic Fermentation. *Fermentation*, 8(2), 90. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020090>
- Grisson, M. S., Brocard, L., Fouillen, L., Nicolas, W., Wewer, V., Dörmann, P., Nacir, H., Benitez-Alfonso, Y., Claverol, S., Germain, V., Boutté, Y., Mongrand, S., & Bayer, E. M. (2015). Specific Membrane Lipid Composition Is Important for Plasmodesmata Function in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(4), 1228-1250. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135731>
-

- INRAE, IFV, CIVC, Sicarex Beaujolais, CA 84, CA 33, & IFV Val de Loire. (2018). Floréal (fiche variétale) Col-2007G. https://observatoire-cepages-resistants.fr/wp-content/uploads/2022/01/fiche_cepage_FLOREAL-fusionne.pdf
- Malina, C., Yu, R., Björkeröth, J., Kerkhoven, E. J., & Nielsen, J. (2021). Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2112836118>
- Mercier Frères. (2020). Sauvignac (fiche variétale) C.O.V 2014/0347. https://observatoire-cepages-resistants.fr/wp-content/uploads/2022/01/fcihe_cepage_sauvignac-fusionne.pdf
- Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Sablayrolles, J.-M., & Farines, V. (2017). Impact of initial lipid content and oxygen supply on alcoholic fermentation in champagne-like musts. *Food Research International*, 98, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.010>
- Pinheiro, J., Bates, D., & R Core Team. (2022). *nlme : Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Rollero, S. (2015). *Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par Saccharomyces cerevisiae en fermentation oenologique* [Phdthesis, Montpellier SupAgro]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01696954>
- Sablayrolles, J. M., Barre, P., & Grenier, P. (1987). Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnology Techniques*, 1(3). <https://doi.org/10.1007/BF00227557>
- Salinari, F., Giosuè, S., Tubiello, F. N., Rettori, A., Rossi, V., Spanna, F., Rosenzweig, C., & Gullina, M. L. (2006). Downy mildew (*Plasmopara viticola*) epidemics on grapevine under climate change. *Global Change Biology*, 12(7), 1299-1307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01175.x>
- Schneider, C., Onimus, C., Prado, E., Dumas, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dorne, M. A., Lacombe, M. C., Piron, M. C., Umar-Faruk, A., Duchêne, E., Mestre, P., & Merdinoglu, D. (2019). INRA-ResDur : The French grapevine breeding programme for durable resistance to downy and powdery mildew. *Acta Horticulturae*, 1248, 207-214. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1248.30>
- Seguinot, P. (2019). *Vers une meilleure exploitation du potentiel enzymatique et métabolique de Metschnikowia pulcherrima et Torulaspora delbrueckii pour la production d'arômes en fermentation oenologique* [Theses, Université de Montpellier]. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-02957583>
- 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(2), 139-173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Taherzadeh, M. J., Adler, L., & Lidén, G. (2002). Strategies for enhancing fermentative production of glycerol—A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1), 53-66. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00069-8)
- Tesnière, C. (2019). Importance and role of lipids in wine yeast fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(20), 8293-8300. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10029-4>
- Wingerter, C., Eisenmann, B., Weber, P., Dry, I., & Bogs, J. (2021). Grapevine Rpv3-, Rpv10- and Rpv12-mediated defense responses against *Plasmopara viticola* and the impact of their deployment on fungicide use in viticulture. *BMC Plant Biology*, 21(1), 470. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03228-7>
- Zheng, Z., & Zou, J. (2001). The Initial Step of the Glycerolipid Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 41710-41716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104749200>
-

Résumés

Le potentiel œnologique des nouvelles variétés résistantes n'est pas encore entièrement connu. L'objectif de ce stage est donc de tester plusieurs itinéraires de vinification pour deux variétés résistantes de raisin blanc (Sauvignac et Floréal). Les données collectées au cours de ce stage montrent le rôle clé des bourbes. En effet, il existe une corrélation positive entre l'ajout de bourbes, la viabilité, la durée de fermentation et la synthèse d'arômes fermentaires. Néanmoins, la viabilité varie fortement en fonction de la souche utilisée et il existe de fortes interactions entre les deux paramètres évalués dans ce travail. Par la suite, il serait intéressant d'étudier des stratégies de gestion nutritionnelles prenant en compte les comportements fermentaires d'autres souches de levures avec d'autres niveaux de bourbes et d'autres variétés résistantes.

Mots clés : Sauvignac, Floréal, fermentation, variété résistante, vin, turbidité, viabilité.

The oenological potential of the new resistant varieties is not fully known yet. The objective of this internship is then to test several winemaking routes for two resistant varieties of white grapes (Sauvignac and Floréal). The data collected during this internship confirm the role of the grape solids already identified in the bibliography. Indeed, there is a positive correlation between the addition of grape solids, the viability, the duration of fermentation and the synthesis of fermentation aromas. Nevertheless, the results obtained for the two musts show a low yeast viability (between 7.31% and 88.30%), even for 3% of added grape solids. The choice of strain is then decisive, demonstrating the interaction between these two parameters. Subsequently, it would be interesting to study nutritional management strategies taking into account the fermentation behaviour of other yeast strains with other levels of lees and other resistant varieties.

Key words : Sauvignac, Floréal, fermentation, resistant variety, wine, turbidity, viability
