



BIOLAFFORT

LEVURES : Back to basics.....

Joana COULON, Philippe MARULLO,
Margaux BERNARD, Chantal MANSOUR,
Virginie MOINE

Au début était *Saccharomyces cerevisiae*.....

- *S. cerevisiae* associée à la fermentation de nombreux produits.
 - Rarement trouvée dans des environnements hors activité humaine.
- ADN de *S. cerevisiae* mis en évidence dans des jarres présentes dans la tombe du Roi Scorpion I (3200 av. JC), Egypte (Cavalleri et al., 2003).
- Activité fermentaire (riz, fruits...) détectée dans des poteries du néolithique (6000-7000 av. JC), Chine (Mc Govern et al., 2004).
- Aujourd'hui trouvée dans les chais et sur les raisins (Mortimer et Polsinelli, 1999).

Une espèce domestiquée

Mais d'où vient-elle initialement ?

- Origine : écorce des arbres (Chine, Malaisie ?).
 - Transport par les insectes.
- Colonisation de niches fermentescibles (Chine -> Egypte ?).

Domestication par sélection, sur des critères de plus en plus pertinents au niveau oenologique.

BUT DE LA PRÉSENTATION

- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Bilan SO₂.
- Fructophilie.

Petit rappel taxonomique : *S. cerevisiae* vs *S. bayanus*.

Critères phénotypiques (1970)

Plusieurs espèces dans le genre *Saccharomyces* dont :

- *S. cerevisiae* (Gal+)
- *S. bayanus* (Gal-).

....et bien d'autres

A la préhistoire de la taxonomie, « *S. bayanus* » désignait des souches de *S. cerevisiae* décrites comme ne fermentant pas le galactose « Gal- ».

Aujourd'hui, l'espèce *S. bayanus* existe, mais ne correspond plus au groupe désigné « Gal- » en 1970.

Critères génétiques (1990)



S. bayanus : aujourd'hui, une espèce bien distincte de *S. cerevisiae*, non adaptée à l'œnologie (bière).

Petit rappel taxonomique.

Pourquoi une distinction entre « *cerevisiae* » et « *bayanus* » en oenologie ?

Peynault et Domercq, 1953 : description d'un groupe de souches, **Gal -**, souvent rencontrées en fin de fermentation alcoolique.

⇒ **Désignées comme ayant de meilleures aptitudes fermentaires.**

Frezier (1992) : les souches **Gal-** ne sont pas toujours dominantes dans les fermentations spontanées.

⇒ « **La notion de souche est plus importante que la notion de race** ».

Mais encore aujourd'hui, les souches anciennement « *bayanus* » = **Gal -** sont préconisées dans les cas de reprise de fermentation, sur la base des observations de Peynault et Domercq...

Mais d'autres critères sont plus importants.....(la suite de l'histoire pour plus tard...) !

Rappel sur certains critères descriptifs des souches œnologiques :

- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Production de SO₂.
- Fructophilie.

S. cerevisiae et killer.

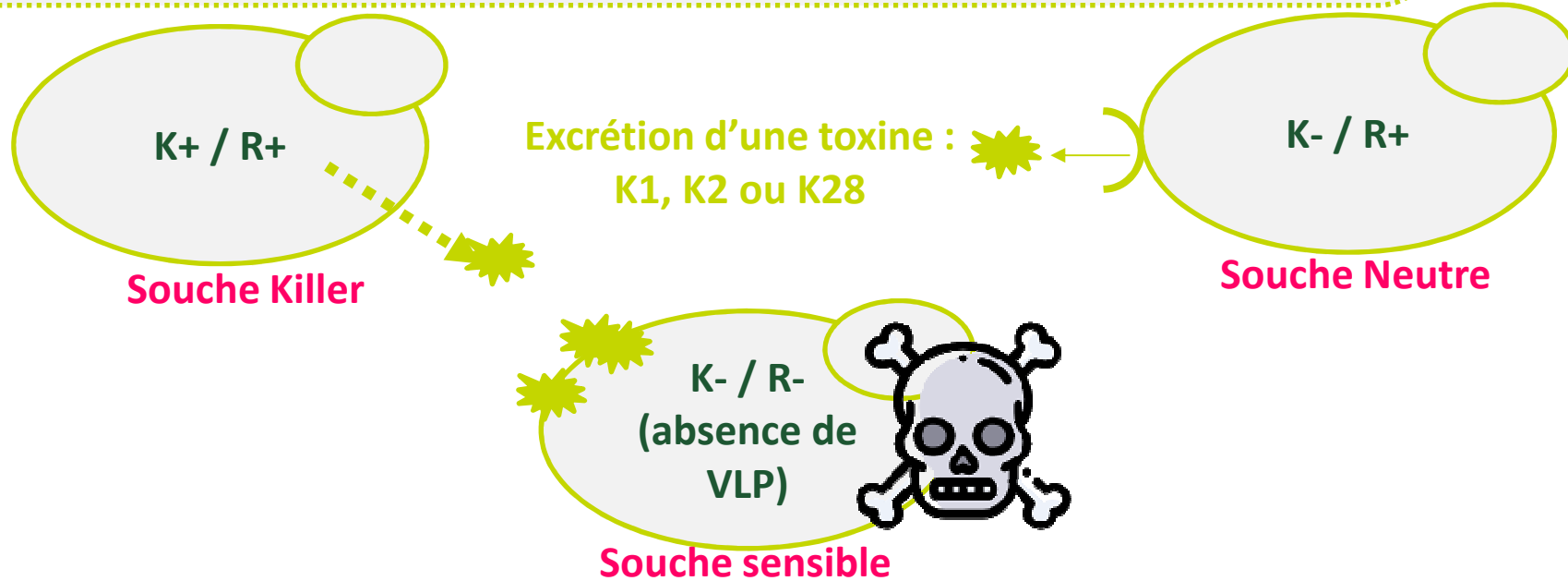
Les souches contiennent des VLP (Virus Like Particle) mycovirus non infectieux.

Ces mycovirus permettent :

- La synthèse d'une toxine K.

ET/OU

- La synthèse d'un facteur d'immunité R.



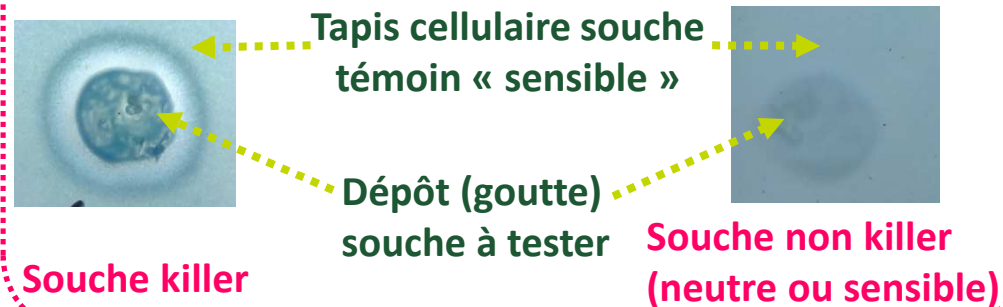
K1 - thermosensible, $\text{pH}_{\text{optimum}} = 4,2-4,6 \Rightarrow$ ne peut pas avoir d'activité au pH du vin.

K2 - plus abondante, $\text{pH}_{\text{optimum}} = 2,8-4,8 \Rightarrow ?$

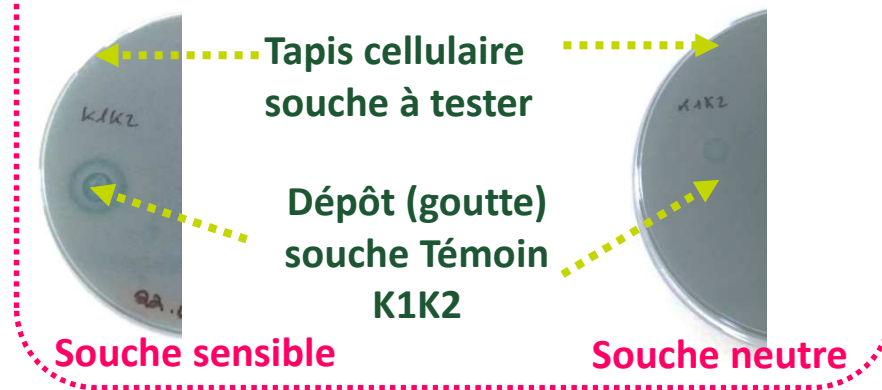
S. cerevisiae et killer.

Un test robuste.

① La souche est-elle « killer » ?



② La souche est-elle neutre ou sensible ?



S. cerevisiae et killer.

Mais des données œnologiques variables.

⇒ Exemple de ce qui peut être trouvé dans la littérature scientifique :

Guiterrez et al., 2011.

Table 3 Frequency (%) of the different *S. cerevisiae* phenotypes at the CIDA winery over a five-year period from 1994 to 1998. Data given is the average from all the tanks tested each year (12 in 1994, 10 in 1995, 6 in 1996, and 7 in 1997 and 1998).

	1994			1995			1996			1997			1998		
	VF ^a	EF	AF	VF	EF	AF	VF	EF	AF	VF	EF	AF	VF	EF	AF
Killer	64	nd ^b	64	15	33	24	17	29	23	17	37	27	12	10	11
Neutral	36	nd	36	26	62	44	83	67	75	81	50	66	4	3	3
Sensitive	0	nd	0	59	5	32	0	4	2	2	13	7	84	87	86

^aVF: vigorous fermentation; EF: end fermentation; AF: average fermentation.

^bnd: no data

✓ pH du vin non compatible avec l'activité des protéines killer, surtout K1 (test non réalisé pH vin).

✓ Interaction avec les composés phénoliques (en moût rouge).

⇒ **Le facteur killer : un phénotype peu pertinent en œnologie.**
(même si 70 % souches gamme « neutres » ou « killer »).

Rappel sur certains critères descriptifs des souches œnologiques :

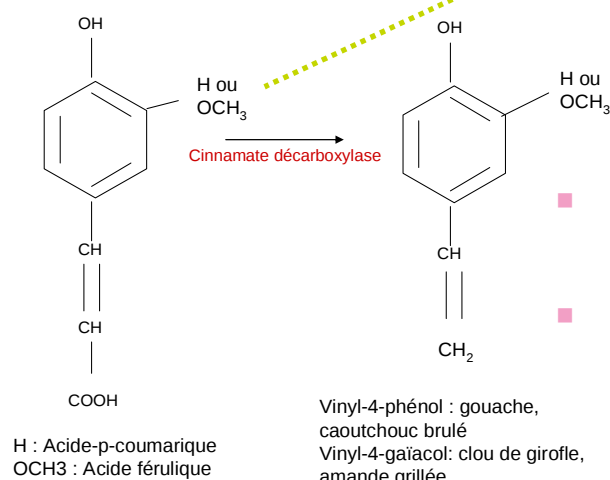
- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Production de SO₂.
- Fructophilie.

Le caractère POF.

Phenolic Off-Flavor

Les souches de *S. cerevisiae* sont distinguées selon leur caractère :

- POF + : capacité à produire des vinyl-phénols.
- POF - : Ø.



Activité enzymatique codée par le gène **PAD1** (phenyl acryl acid decarboxylase).

- **Acides cinnamiques** : propriétés antiseptiques-> POF+ -> résistance.
- **Brasserie, œnologie** : acides hydroxycinnamiques.

Les deux formes du gène **PAD1** :

- Forme **PAD1** -> enzyme fonctionnelle -> **POF+**
- Forme **PAD1*** -> changement site catalytique de l'enzyme (asp¹²³/gly¹²³) -> enzyme non fonctionnelle -> **POF-**

BREVET LAFFORT

10 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE	11 N° de publication : 2 920 437
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE	12 N° d'enregistrement national : 07 57245
PARIS	
13 INT. C ⁶ : C 12 N 15/01 (2013.01), C 12 Q 1/04, 1/08, C 12 R 1/06	
14 BREVET D'INVENTION	B1
15 PROCÉDE DE SÉLECTION DE LEVURES OENOLOGIQUES.	
16 Date de dépôt : 29.08.07.	17 Références à d'autres documents nationaux apparentés :
18 Priorité :	
19 Date de mise à la disposition du public de la demande : 06.03.09 Bulletin 0910.	20 Demandeur(s) : SOCIÉTÉ D'APPLICATIONS DE RECHERCHES ET DE CONSEILS OENOLOGIQUES SARLCO Société anonyme - FR.
21 Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 06.03.13 Bulletin 1310.	22 Inventeur(s) : MARULLO PHILIPPE.

Le caractère POF.

- Seuil de détection : 4VP + 4VG (1:1) = 725 µg/L.
- Concentrations différentes détectées selon les types de vins (Chatonnet et al., 1993).

	Concentrations maximales dans les vins		
	Vin Blanc	Vin rosé	Vin rouge
4-VP (µg/L)	1150	215	111
4-VG (µg/L)	496	75	57

- **Inhibition** de l'activité de PAD1p par certains composés phénoliques (tanins catéchiques).

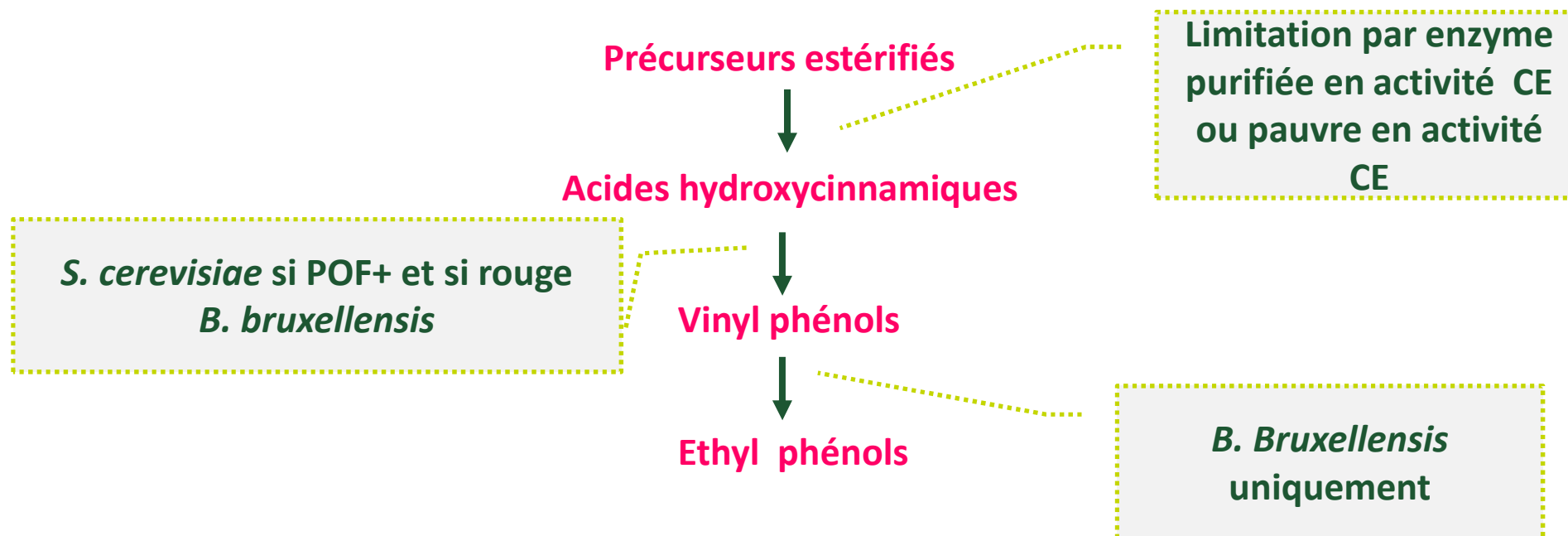
⇒ Intérêt des souches POF- en vin blanc davantage qu'en vin rouge.

Les souches de la gamme POF- :
Gamme Zymaflore® : VL1, VL2, X16, CX9,
Alpha^{TD}, Egide^{TDMP}.
Gamme Actiflore® : Actiflore Rosé.

*Test en conditions de laboratoire :
Milieu + acides hydroxycinnamiques ->
croissance -> dosage des vinyl-phénols.*

Le caractère POF.

- Influence du caractère POF+/POF- en association avec l'utilisation d'une enzyme purifiée en activité cinnamyl estérase (ou à faible activité CE).



Donc l'utilisation d'enzymes pauvres/sans activité CE

- **Sur moût blanc et rosé** : permet de s'affranchir du caractère POF de la levure choisie.
- **Sur moût rouge** : pas d'incidence du caractère POF+/POF- mais si pression de *B. bruxellensis* importante.

Rappel sur certains critères descriptifs des souches œnologiques :

- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Production de SO₂.
- Fructophilie.

S. cerevisiae et SO₂.

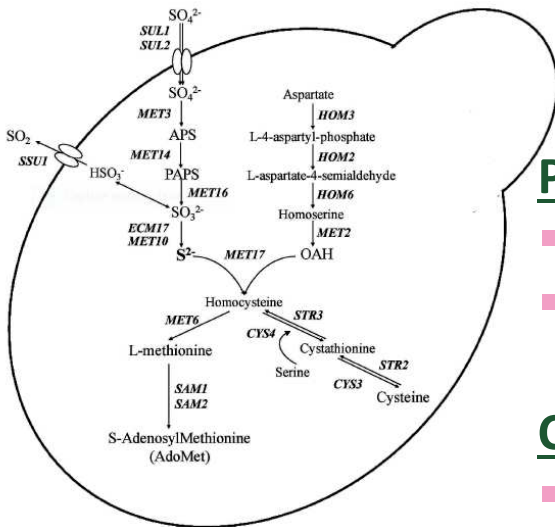
Quelle est l'évolution du SO_2 en fermentation alcoolique ?

	SO ₂ total (mg/L)		
	moût	Minimum fin FA	Maximum fin FA
Cabernet sauvignon 2015	35	39	56
Merlot 2014	37	38	53
Merlot 2015	46	39	55
Sauvignon blanc 2014	34	38	61
Sauvignon blanc 2015	67	48	85

Pour chaque moût : 34
levures différentes testées
en triplicata (thèse E.
Peltier, 2017) $\Rightarrow$ 510
dosages.

$$\text{SO}_2 \text{ fin FA} = \text{SO}_2 \text{ départ} + \text{production} - \text{consommation}.$$

⇒ **BILAN SO₂** (variable d'une levure à l'autre).



Production :

- **A partir des sulfates du moût** (Jiranek et al., 1995, Eschenbruch, 1974).
- **Autres précurseurs ?**

Consommation :

- Voie de synthèse de Cys et Met via H_2S .

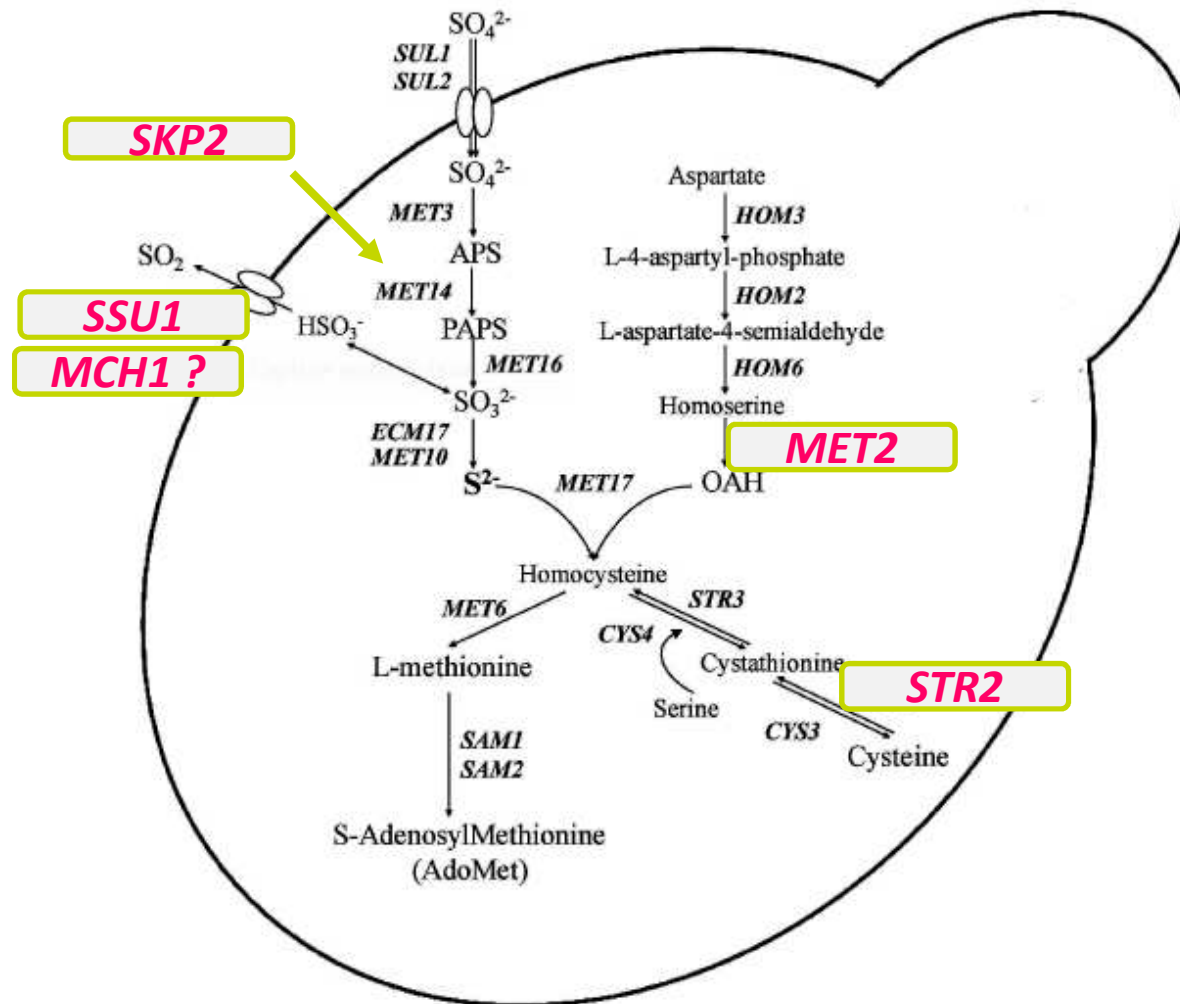
S. cerevisiae et SO₂.

Quels déterminants jouent sur le bilan SO₂ ?

Quantité de SO₂ au départ.

Quantité de précurseurs
(sulfates).

Déterminants génétiques.



Mendez-Ferreira et al., 2010 ; Noble et al., 2015 ; Peltier 2017.

S. cerevisiae et SO₂.

Classement des souches selon leur bilan SO₂ :

- Souches « conso⁺ » : VL1, XPURE, F33, Cerevisiae.
- Souches « conso⁻ » : F83.

La moitié des souches ont un profil « conso⁺ »

Quels outils pour éviter un bilan SO₂ trop lourd ?

- Alléger le sulfitage des moûts (impact sur SO₂ mais surtout sur le pouvoir combinant).
- Limiter la présence de sulfates ?

BILAN SO ₂ (et TL35)		
	SO ₂ initial à 30 mg/L	SO ₂ initial à 70 mg/L
Levure « conso ⁻ »	+ 39 mg/L (150)	+ 45 mg/L (181)
Levure « conso ⁺ »	+ 3 mg/L (100)	+ 3 mg/L (141)

Bilan SO₂ et TL35 souvent liés : une souche fortement « productrice » de SO₂ aura tendance à synthétiser plus de composés le combinant.

Rappel sur certains critères descriptifs des souches œnologiques :

- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Production de SO₂.
- Fructophilie.

S. cerevisiae et fructophilie.

	Glucose	Fructose
Moût de raisin	50 %	50 %
Vin en arrêt de FA	< 50 %	> 50 %
Quelques exemples du dernier millésime (sucres résiduels)		
Vin 1	2,53 g/L	4,04 g/L
Vin 2	1,24 g/L	3,16 g/L
Vin 3	1,40 g/L	3,69 g/L

S. cerevisiae métabolise plus facilement le glucose que le fructose.

La concentration plus importante de fructose est une conséquence et non une cause de l'arrêt fermentaire.

- Métabolisation des sucres : Le point limitant est leur **transport** -> importance du transporteur **Hxt3p** en conditions œnologiques. Luyten et al., 2002.
- Les transporteurs, dont **Hxt3p**, ont **plus d'affinité pour le glucose que pour le fructose**.
- L'accumulation **d'éthanol** augmente la **difficulté** de faire entrer le fructose (forme fructopyranose -> fructofuranose, plus difficile à transporter). Berthels et al., 2004.

S. cerevisiae et fructophilie.

En situation d'arrêt $\Rightarrow$ double peine pour *S. cerevisiae* :

- Présence d'éthanol.
- Ratio Glucose / Fructose < 1 .
- Il existe **différentes formes** de HXT3p, dont une confère le caractère « **fructophile** » aux souches $\rightarrow$ **HXT3***. (Guillaume et al., 2007).

Nécessité de souches fructophiles.

Souche	Génotype	Phénotype
Actiflore BO213	HXT3*/HXT3*	Fructophile
Zymaflore Spark	HXT3*/HXT3	Fructophile
Zymaflore VL1	HXT3/HXT3	-

Normalement, le fait de n'avoir qu'une copie de HXT3* suffit à rendre la souche fructophile (mais deux c'est peut-être mieux !).

Mais encore aujourd'hui, les souches anciennement « bayanus » = Gal - sont préconisées dans les cas de reprise de fermentation, sur la base des observations de Peynault et Domercq... ?????

$\Rightarrow$ **Beaucoup de souches anciennement *S. bayanus* sont fructophiles, mais pas toutes.**

(19) United States	
(12) Patent Application Publication	(10) Pub. No.: US 2008/0138873 A1
Pellerin et al.	(43) Pub. Date: Jun. 12, 2008
(54) YEAST STRAINS WITH IMPROVED FRUCTOSE FERMENTATION CAPACITY	(30) Foreign Application Priority Data
	Dec. 19, 2003 (EP) 03078992.9
(76) Inventors: Patrice Jacques Marie Pellerin, Laverune (FR); Bruno Blondin, Montpellier (FR); Jean-Marie Sablayrolles, Montpellier (FR); Carole Guillaume, Saint George d'Orques (FR)	Publication Classification
	(51) Int. Cl.
	C12P 1/02 (2006.01)
	C07K 14/00 (2006.01)
	C07H 21/00 (2006.01)
	C12N 1/00 (2006.01)
	C12N 15/01 (2006.01)
Correspondence Address: NIXON & VANDERHYE, PC 901 NORTH GLEBE ROAD, 11TH FLOOR ARLINGTON, VA 22203	(52) U.S. Cl. 435/171; 530/350; 536/23.74; 435/254.2; 435/440; 435/254.21

S. cerevisiae et fructophilie.

Ce qu'apporte la fructophilie :

- De meilleures aptitudes pour la reprise de fermentation.
- Un meilleures aptitudes fermentaires pour terminer les fermentations.

EN CONCLUSION

Les levures œnologiques sont caractérisées selon un certain nombre de critères :

⇒ **Importance de disposer d'un langage commun et de tests comparatifs :**

- Pour pouvoir comparer les levures entre elles.
- Pour les réaliser dans différents endroits et à différents moments.

Rappel sur certains critères descriptifs des souches œnologiques :

- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Production de SO₂.
- Fructophilie.

Peu pertinent en œnologie.

- Non démontré de façon formelle.

KILLER

Rappel sur certains critères descriptifs des souches œnologiques :

- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Production de SO₂.
- Fructophilie.

Lié à une **forme spécifique** du gène ***PAD1*** (cinnamate décarboxylase).

BREVET LAFFORT.

POF+/POF-

FRUCTOPHILIE

- En situation d'arrêt de FA, la **concentration en fructose est supérieure à celle du glucose**.
- La majorité des souches sont **glucophiles**.
- **BO213 possède une forte aptitude à la fructophilie (allèle particulier du transport des sucres)-> souche de reprise de FA par excellence.**

Rq : Cette aptitude à la reprise de FA n'est pas liée à son passé « d'ancienne bayanus ».

Rappel sur certains critères descriptifs des souches œnologiques :

- Caractère killer.
- Capacité à produire des vinyl-phénols.
- Production de SO_2 .
- Fructophilie.

Bilan SO_2

- **Le bilan SO_2 : résultat production / consommation.**
- **De nombreuses souches sont « conso⁺ ».**
- **Non lié à H_2S , mais lié au TL35.**

MERCI DE VOTRE ATTENTION