

Bioprospection de *Metschnikowia pulcherrima* pour la vinification du chasselas

Valentina Bianconi¹, Federico Sizzano¹, Marie Blackford^{1,2}, Hélène Berthoud³, Laurent Amiet¹, Sébastien Bailly¹, Frédéric Vuichard⁴, Christine Monnard⁴, Stefan Bieri⁴, Jean-Laurent Spring⁵, Yannick Barth⁶, Corentin Descombes⁶, François Lefort⁶, Marylin Cléroux², Scott Simonin², Charles Chappuis², Gilles Bourdin¹ et Benoît Bach²

¹Agroscope, 1260 Nyon, Suisse

²École de Changins, 1260 Nyon, Suisse

³Agroscope, 3003 Liebefeld, Suisse

⁴Agroscope, 1260 Nyon, Suisse

⁵Agroscope, 1009 Pully, Suisse

⁶HEPIA, 1202 Genève, Suisse

Renseignements: Federico Sizzano, E-Mail: federico.sizzano@agroscope.admin.ch

<https://doi.org/10.34776/afs16-111> Date de publication: 19 août 2025



Vigne au printemps (à gauche) et analyse des échantillons en fermentation par cytométrie en flux (à droite).

Photos: Carole Parodi, Agroscope (à gauche), Géraldine Zosso, Agroscope (à droite)

Résumé

L'intérêt pour la bioprospection ne cesse de croître dans le domaine de l'œnologie. Cette pratique consiste à identifier des micro-organismes (levures, bactéries) présentant des propriétés utiles pour la vinification, comme la protection du moût, l'acidification naturelle ou l'enrichissement aromatique, tout en préservant la typicité des vins. À ce propos, de précédents travaux de recherche ont montré que l'utilisation de levures non-*Saccharomyces* telles que *Metschnikowia pulcherrima* permet à la fois de protéger les moûts contre l'altération microbienne et d'influencer le profil aromatique des vins. Cet article décrit l'isolement, la caractérisation et l'utilisation en vinification d'une souche autochtone de *Metschnikowia pulcherrima*. Les essais ont été réalisés à deux échelles: en laboratoire en 2021 et à la cave expérimentale au cours

du millésime 2022 sur du moût de chasselas. Les résultats obtenus par cytométrie en flux montrent que *Metschnikowia pulcherrima* a une activité métabolique élevée et qu'elle n'empêche pas la fermentation de *S. cerevisiae*. Après les essais à l'échelle cave, l'analyse sensorielle met en évidence une légère contribution positive de cette levure au profil aromatique du vin (arômes fruités et lactiques plus prononcés) par rapport à la vinification du témoin. Les résultats globaux suggèrent que notre stratégie de bioprospection pour guider la sélection de micro-organismes indigènes peut être efficacement utilisée dans le processus de vinification.

Key words: non-*Saccharomyces* yeasts, flow cytometry, bioprospection, chasselas, *Metschnikowia pulcherrima*.

Introduction

La bioprospection est définie comme «la recherche systématique et organisée de produits utiles dérivés de bioressources, notamment des plantes, des micro-organismes et des animaux, qui peuvent être développés en vue d'une commercialisation et d'un bénéfice global pour la société» (Oyemitan., 2017).

En vinification, l'approche de la bioprospection peut être utilisée pour différents objectifs. Par exemple, certaines levures non-*Saccharomyces*, comme *Lachancea thermotolerans*, ont été isolées, caractérisées et commercialisées pour leur capacité à produire de l'acide lactique, ce qui permet d'augmenter l'acidité du vin dans les millésimes chauds (Morata et al., 2018).

Un autre objectif est d'identifier et de caractériser de nouveaux micro-organismes afin de créer une complexité aromatique caractéristique de certaines fermentations spontanées (Chen et al., 2022). À ce propos, l'utilisation de levures non-*Saccharomyces* comme *Candida zemplinina* en fermentation séquentielle (FS) avec *S. cerevisiae* peut entraîner une augmentation quantitative des terpénols et une diminution des concentrations d'esters d'acétate et d'aldéhydes, comme l'ont montré Sadoudi et al., (2012). En outre, les espèces de levures et le rapport entre les genres non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* peuvent influencer les propriétés organoleptiques du produit final (Renault et al., 2015; Fleet et al., 1993).

Par conséquent, la bioprospection de levures non-*Saccharomyces* semble être une stratégie intéressante pour garantir la qualité du vin et éviter les problèmes d'altération potentiels tout en apportant des caractéristiques aromatiques favorables au vin fini.

Parmi les non-*Saccharomyces*, une levure d'intérêt œnologique, *Metschnikowia pulcherrima* (Mp), est généralement détectée dans les moûts de raisin à des concentrations allant de 5 % à 40 %, et présente généralement un faible pouvoir fermentaire (Combina et al., 2005; Prior et al., 2019; Capozzi et al., 2015; Zott et al., 2011). Il a été démontré que Mp a un impact sur la fermentation en raison de la libération de composés aromatiques tels que les thiols variétaux et les alcools supérieurs, avec une faible production d'acétate, d'éthanol et d'acides (Rodríguez et al., 2010; Comitini et al., 2011). Dans cet article, nous décrivons le processus de bioprospection d'une souche de Mp et son utilisation dans la vinification du moût de chasselas en laboratoire (2021) et ensuite en cave expérimentale (durant le millésime 2022). L'objectif était d'étudier si cette levure pouvait contribuer à l'enrichissement aromatique des vins de chasselas.

Matériel et méthodes

Isolement et identification génétique de micro-organismes

L'isolement des micro-organismes a été effectué de mai à octobre 2021 dans huit domaines situés dans quatre cantons suisses (Genève, Vaud, Neuchâtel et Valais), aussi bien à la vigne qu'à la cave. Dans le vignoble, différentes parties de la plante (écorce de la vigne, fleurs et baies entières) et différentes zones de la parcelle ont été prélevées à l'aide de ciseaux désinfectés.

En cave, l'échantillonnage a été effectué par frottis avec des écouvillons stériles sur l'équipement dans différents endroits du chai. Ensuite, les échantillons prélevés ont été placés dans des tubes stériles, puis apportés au laboratoire pour identifier génétiquement les espèces récoltées.

Les échantillons prélevés ont permis d'isoler environ 300 différentes levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*. Ces dernières ont été multipliées sur un milieu YPD enrichi en éthanol à 3 % ou 6 % ainsi qu'en antibiotiques pour inhiber la croissance des bactéries. Les colonies obtenues ont été isolées selon leur morphologie, puis purifiées et cultivées sur gélose YPD pendant deux jours. Leur ADN a ensuite été extrait et le domaine D1/D2 du gène de l'ARNr 26s a été amplifié par PCR et séquencé. Ensuite, les séquences obtenues ont été comparées à la base de données génétiques Nucleotide database (NCBI, USA) afin d'identifier les espèces de levures (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Fermentations en laboratoire et en cave

Parmi la collection des levures sélectionnées, une souche de Mp a été choisie pour tester sa compatibilité avec *S. cerevisiae* (Sc) en FS. À ce propos, nous avons réalisé une micro-vinification à l'échelle laboratoire à partir d'un moût de chasselas congelé (millésime 2021). Le moût a été pasteurisé à 60 °C pendant 20 minutes, puis rapidement refroidi. Deux conditions ont été comparées: une fermentation classique (CC) avec ensemencement de Sc commerciale seule (Lalvin CY3079, Lallemmand, France), réhydratée et inoculée dans le moût selon les instructions du fabricant (20 g/hL), et une FS dans laquelle la Mp a été inoculée cinq jours avant la Sc. Pour pouvoir inoculer le moût avec la Mp isolée, une colonie de levure a été prélevée sur une culture en boîte de Petri, inoculée en milieu YPD liquide et multipliée pendant 24 heures à 30 °C sous agitation. Après avoir déterminé la viabilité des cellules par cytométrie en flux (FCM), la culture a été centrifugée, puis remise en suspension dans le moût (bouteilles de 500 mL). Les densités (exprimées

en degrés Oechsle) ont été mesurées quotidiennement à l'aide d'un densimètre portable.

Les fermentations ont été considérées comme terminées après au moins cinq lectures négatives consécutives. Parallèlement, des échantillons ont été prélevés pour la détermination des principaux paramètres biochimiques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Dans le cadre de l'expérience en cave, les raisins de chasselas du domaine Agroscope de Pully (Suisse) du millésime 2022 ont été récoltés, foulés, pressés, puis traités avec du bisulfite d'ammonium et de la pectinase. Après clarification au moyen de bentonite et une décantation de 24 heures, le moût a été réparti dans trois cuves de 100 L. Une supplémentation avec du phosphate d'ammonium (30 g/hL) a été effectuée afin de fournir 60 mg/L d'azote assimilable. La fermentation a été réalisée dans trois conditions: classique cuve (CC) avec inoculation de Sc, fermentation séquentielle (FS) avec inoculation de Mp suivie de Sc après quatre jours, et pied de cuve (PDC) réalisé à l'aide d'un starter préparé à partir de raisins traités une semaine avant la récolte. La fermentation alcoolique (FA) a eu lieu à 20 °C et s'est terminée au bout de 5 à 7 jours, le sucre résiduel étant inférieur à 1 g/L. À différentes étapes de la FA (moût en cuve, 1/3, 2/3, fin FA), les levures ont été isolées par centrifugation, puis, après extraction de l'ADN, l'amplification et le séquençage d'une partie du gène TEF1-a ont été effectués. L'utilisation du programme Blast (NCBI, USA) a permis d'identifier les différentes espèces. Une fermentation malolactique a ensuite été réalisée avec l'inoculation de *Oenococcus oeni* afin d'éliminer l'acide malique (taux résiduel <0,1 g/L). Enfin, le vin a été stabilisé chimiquement et refroidi à 1 °C pendant un mois. Après une filtration finale, le vin a été mis en bouteille et celles-ci ont été stockées à une température comprise entre 10 et 12 °C avant analyse.

Analyse des moûts et des vins

Pendant la FA (en laboratoire ou en cave), le suivi microbiologique a été effectué par FCM, dont le moût en fermentation a été dilué dans du phosphate buffer saline (PBS) et coloré avec des réactifs fluorescents. Après 15 minutes d'incubation, les échantillons ont été analysés à l'aide d'un analyseur MACSQuant 10 (Miltenyi, Allemagne). Les données ont été traitées avec le logiciel Flow Logic (Invai Technologies, Australie) en mesurant le nombre de cellules/mL et l'intensité de fluorescence relative à la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) du Carboxyfluorescéine-diacétate, acétoxyméthyl-ester (CFDA) qui reflète l'activité métabolique cellulaire. Concernant l'aspect sensoriel, après la mise en bouteille, les vins ont fait l'objet d'une analyse sensorielle par un

panel de 12 dégustateurs d'Agroscope à l'aide du logiciel Redjade (Redjade Sensory Solutions, États-Unis). L'intensité de 22 critères a été évaluée sur une échelle de 1 (faible/mauvais) à 7 (élevé/excellent). Les trois modalités anonymisées ont été dégustées de manière comparative dans un ordre aléatoire. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Prism 10 (GraphPad, États-Unis). Des analyses de variance (ANOVA) à une voie ou à deux voies avec des post-tests appropriés ont été utilisées.

Résultats

Caractérisation d'une souche de Mp isolée dans le canton de Vaud

À la suite de la bioprospection, sept genres de levures différents ont été isolés, dont le genre *Metschnikowia*, qui représentait 24 % de la population totale de levures (Figure 1). L'analyse moléculaire a permis d'identifier cinq espèces de *Metschnikowia*, notamment: *M. pulcherrima*, *M. reukaufii*, *M. fructicola*, *M. guessi* et *M. viticola*. Après l'isolement et la constitution d'une bio banque, les souches de *Metschnikowia* identifiées ont été testées en conditions de fermentation afin de mesurer les paramètres biochimiques et les composés volatils. L'objectif était de trouver une levure à faible pouvoir fermentaire produisant d'importantes quantités d'alcool supérieur (comme le 2-phényléthanol) et de faibles niveaux de composés indésirables tels que l'acide acétique ou l'acétaldéhyde. Les résultats ont montré une grande variabilité entre les isolats, notamment pour l'acétaldéhyde, l'acétate d'éthyle et le phényléthanol. Cependant, le pouvoir fermentaire des différentes espèces de *Metschnikowia* s'est révélé limité, avec une production médiane d'éthanol d'environ 2,5 % vol. Une douzaine d'isolats de *Metschnikowia* spp. ont été identifiés comme producteurs de 2-phényléthanol (>90 mg/L), et plusieurs ont

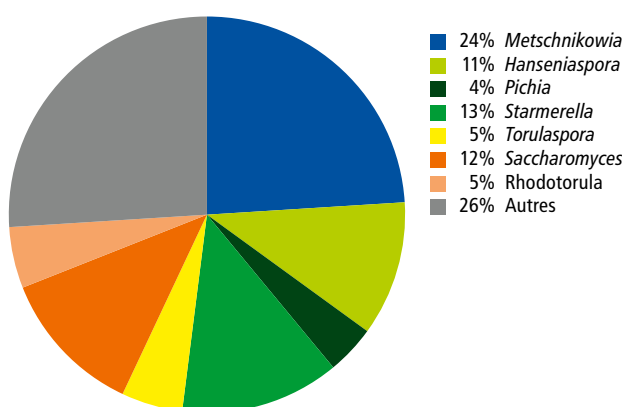


Figure 1 | Les sept principaux genres de levures isolées par bioprospection dans les quatre cantons de la Suisse romande.

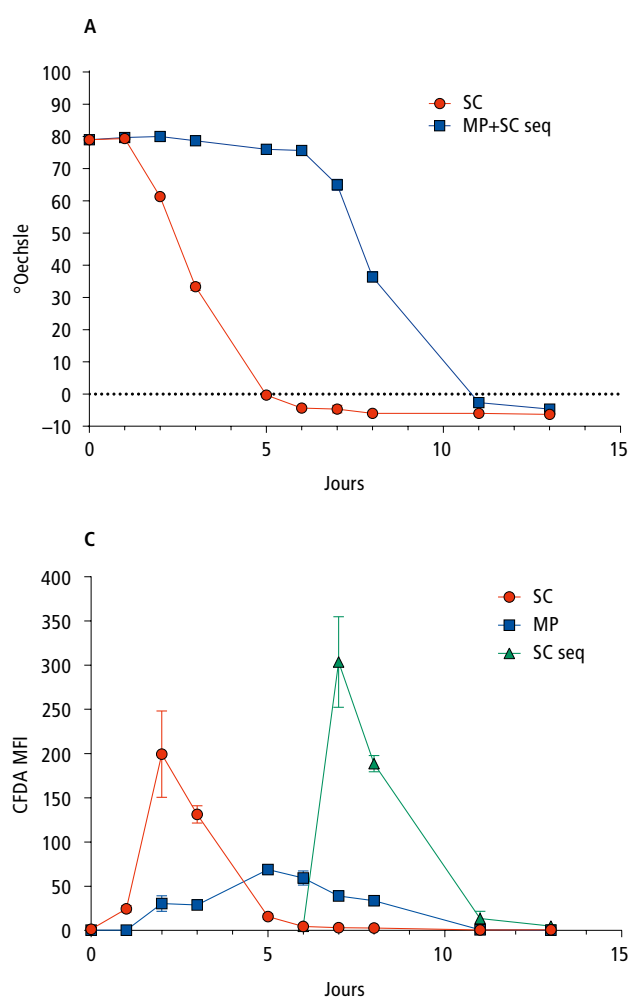


Figure 2 | A. Analyse densitométrique à l'échelle du laboratoire. Sc: Sc; MP + Sc seq: Mp et Sc en FS. B. Cinétique de croissance cellulaire de Sc et Mp à l'échelle du laboratoire obtenue par analyse FCM. Sc: Sc; MP: Mp; Sc seq: Sc en FS. C. Fluorescence CFDA à l'échelle laboratoire obtenue par analyse FCM. Sc: Sc; MP: Mp; Sc seq: Sc en FS.

également produit des niveaux élevés d'acétaldéhyde et d'acétate d'éthyle (jusqu'à 100 et 500 mg/L, respectivement). À l'issue du processus de sélection, la meilleure souche pour la vinification était la souche de Mp isolée dans le canton de Vaud (identifiée par le code UASWS2926 VBI-A02), étant la plus grande productrice de 2-phényléthanol parmi les levures testées (142 mg/L), tout en produisant de faibles niveaux d'acétaldéhyde et d'acétate d'éthyle (15 et 35 mg/L, respectivement). Cette souche a donc été retenue pour poursuivre les expérimentations.

Mp ne fermente pas les sucres et est utilisable avec *S. cerevisiae*

Selon le suivi densitométrique de l'expérience en laboratoire, aucun changement significatif n'a été relevé pour Mp dans la consommation des sucres pendant les premiers jours d'incubation (Figure 2A). D'autre part, l'analyse microbiologique par FCM a révélé que Mp a proliféré pendant les premiers jours, puis que son activité a diminué après l'inoculation de Sc (Figure 2B). L'activité métabolique de Mp a suivi un modèle similaire à

celui de Sc qui a montré une croissance rapide et une forte activité métabolique (Figure 2C).

Pour étudier l'influence en FS de Mp et Sc sur les principaux paramètres biochimiques comparé à une fermentation classique de Sc, nous avons réalisé une analyse HPLC, qui a permis de mettre en évidence que le vin issu de la FS présentait une quantité de tartrate significativement plus faible et une teneur en glycérol plus importante que le vin issu de la fermentation classique avec Sc. Ces résultats suggèrent que Mp pourrait apporter des composants organoleptiques différents lors de la vinification et qu'elle pourrait être utilisée à plus grande échelle pour la vinification du chasselas. À ce propos, pour confirmer ces observations, un essai de vinification à l'échelle de la cave a été réalisé à partir du raisin de chasselas du millésime 2022.

L'essai en cave révèle une grande variabilité des communautés microbiennes

À l'échelle de la cave, Mp a montré peu d'activité fermentaire avant l'inoculation de Sc au jour quatre comme le montrent les données densitométriques (Figure 3A).

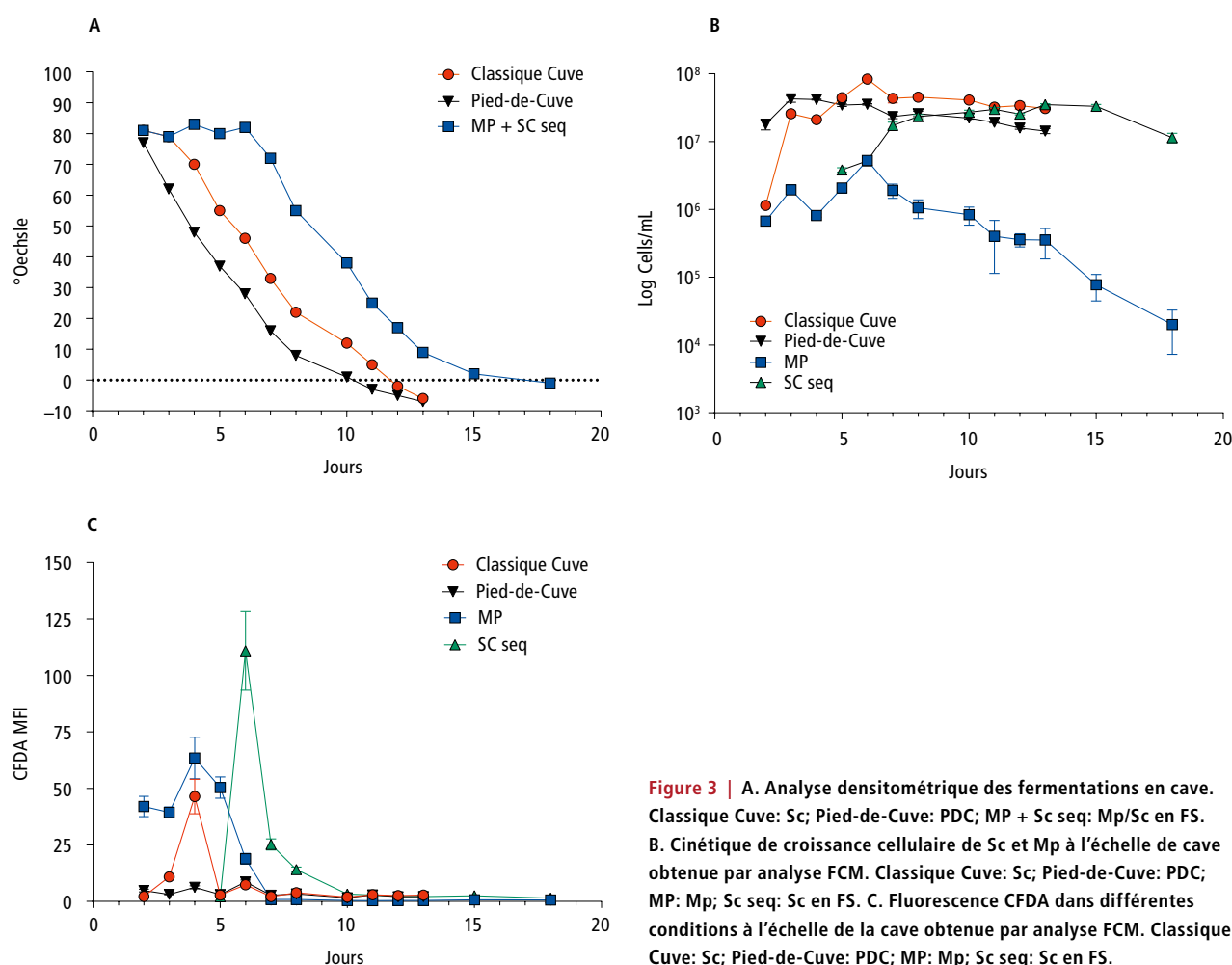


Figure 3 | A. Analyse densitométrique des fermentations en cave. Classique Cuve: Sc; Pied-de-Cuve: PDC; MP + Sc seq: Mp/Sc en FS. B. Cinétique de croissance cellulaire de Sc et Mp à l'échelle de cave obtenue par analyse FCM. Classique Cuve: Sc; Pied-de-Cuve: PDC; MP: Mp; Sc seq: Sc en FS. C. Fluorescence CFDA dans différentes conditions à l'échelle de la cave obtenue par analyse FCM. Classique Cuve: Sc; Pied-de-Cuve: PDC; MP: Mp; Sc seq: Sc en FS.

Selon les résultats obtenus par FCM (en mesurant le nombre de cellules/mL), Mp proliférait et restait viable, bien qu'en faible nombre, jusqu'à la fin de la FA (Figure 3B). De plus, comme pour les résultats en laboratoire, son activité métabolique est restée élevée jusqu'à l'inoculation de Sc (Figure 3C). Nos résultats à l'échelle de la cave reprennent globalement les résultats des fermentations à l'échelle du laboratoire, en particulier en ce qui concerne l'activité métabolique cellulaire CFDA et surtout la quantité des cellules qui diminue à l'inoculation de Sc.

Pour s'assurer de la bonne implantation de notre levure Mp et évaluer la présence d'autres genres/espèces de levures dans la cuve, nous avons recueilli des échantillons à différents stades de la FA pour obtenir des données moléculaires sur la composition des communautés microbiennes présentes dans le moût de chasselas. Nos résultats ont montré une grande variabilité parmi les trois conditions testées (Figure 4). Il est intéressant de noter qu'après l'inoculation de Mp dans le moût, l'abondance relative des levures indigènes telles que *Hanseniaspora*

uvorum ou des champignons tels que *Aureobasidium pullulans* a diminué par rapport à la condition PDC. Il est ainsi à remarquer que dans la condition PDC, *H. uvarum* et d'autres levures ont persisté avec Sc tout au long du processus de fermentation.

Analyse sensorielle: note aromatique apportée par Mp

L'analyse biochimique des vins par FT-IR (Winescan) n'a révélé aucune différence importante en termes de composition des paramètres biochimiques entre les différentes conditions, bien qu'une tendance à une production plus faible d'acide acétique ait été observée dans la condition de FS.

En revanche, l'analyse sensorielle a révélé un caractère légèrement plus «floral» dans le vin FS par rapport au vin PDC, sans différence statistiquement significative entre les vins finis. Enfin, une différence significative a été notée pour un caractère plus «lactique» dans le vin FS, et une préférence pour le vin des conditions CC et FS a été observée par rapport au vin PDC (Figure 5).

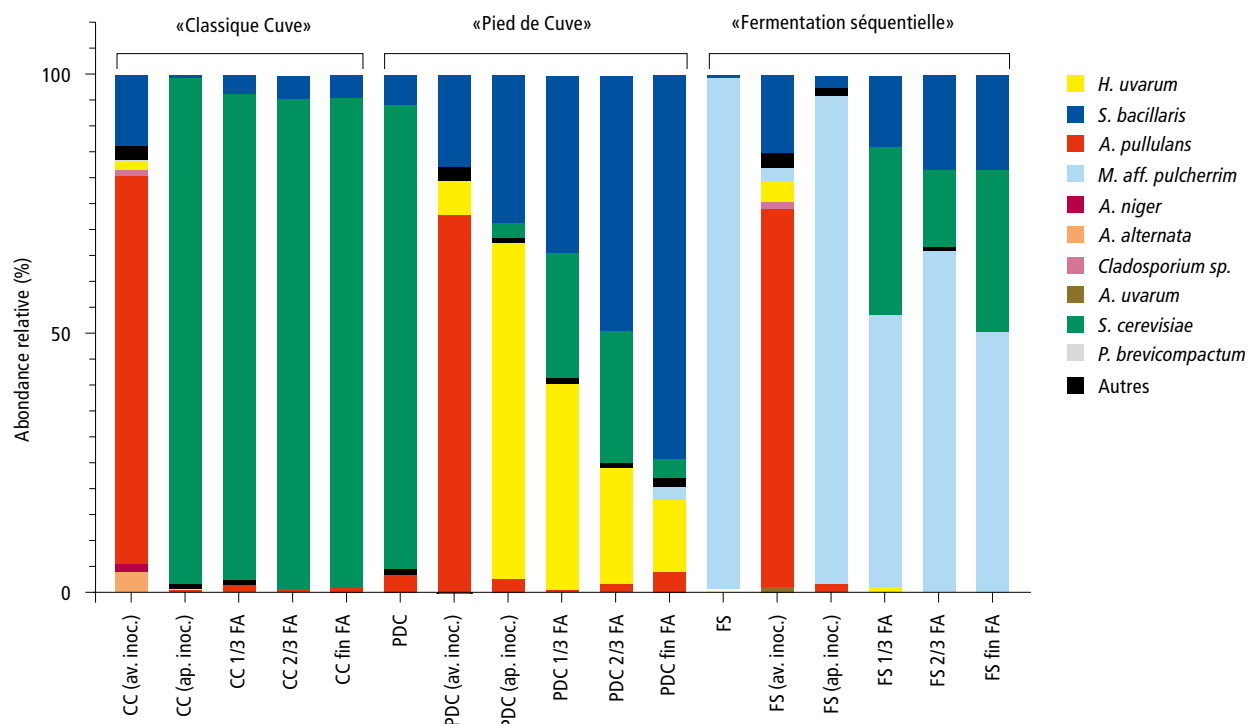


Figure 4 | Abondance relative des levures en fermentation à différents moments de la fermentation en cave. CC (avant inoc.): classique cuve avant l'inoculation du Sc; CC (ap. inoc.): classique cuve après l'inoculation du Sc; CC 1/3, 2/3, fin FA: classique cuve à 1/3, 2/3 et à la fin de la FA. PDC: PDC; PDC (av. inoc.): condition avant l'inoculation du PDC. PDC (ap. inoc.): condition après l'inoculation par le PDC. PDC 1/3, 2/3, fin FA: cuve inoculée par le PDC à 1/3, 2/3 et à la fin de la FA. FS: Mp seul; FS (av. inoc.): état avant l'inoculation de Mp. FS (ap. inoc.): état après l'inoculation de Mp. FS 1/3, 2/3, fin de la FA: Modalité avec FS à 1/3, 2/3 et à la fin de la FA.

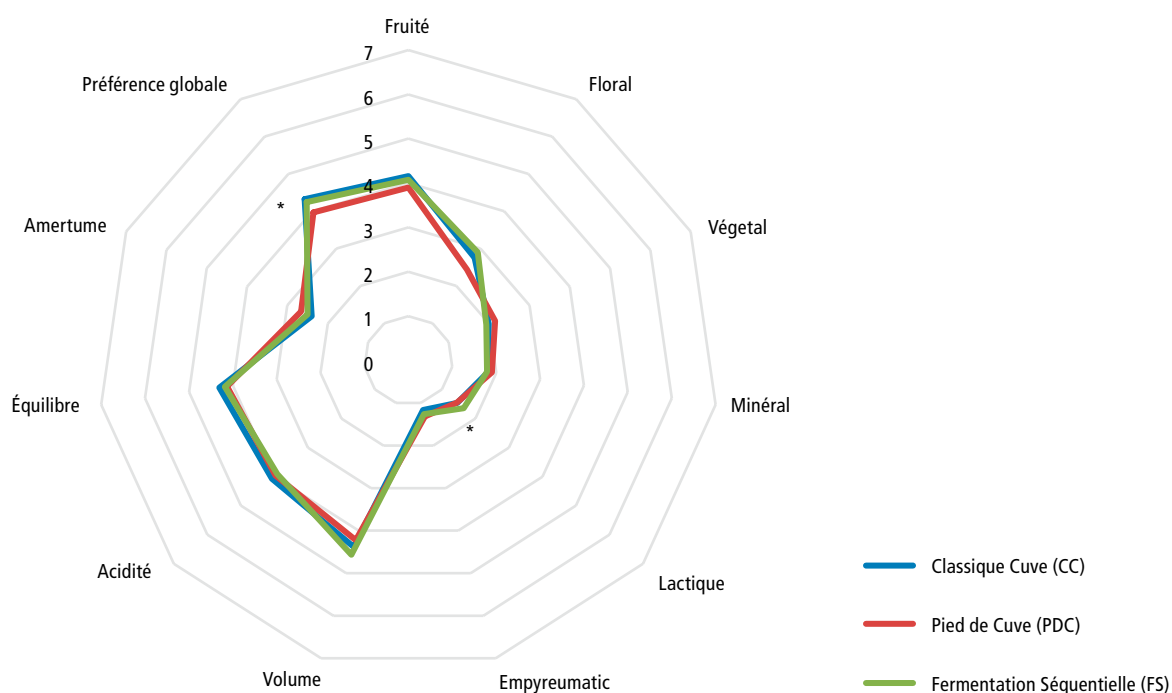


Figure 5 | Graphique radar montrant les résultats de l'analyse sensorielle. Pour la préférence globale: * $p < 0,05$ CC vs PDC; $p = 0,09$ FS vs PDC; pour le lactique: * $p < 0,005$ CC vs FS; $p < 0,005$ PDC vs FS. ANOVA à deux facteurs avec test post-hoc de Tukey.

Conclusions

- La souche indigène de *Metschnikowia* isolée dans le canton de Vaud et utilisée en fermentation séquentielle avec *S. cerevisiae* ne fermente pas les sucres et n'interfère pas avec la fermentation conduite par *S. cerevisiae*.
- Notre outil de cytométrie en flux nous a permis de réaliser un suivi précis de l'activité métabolique cellulaire des espèces présentes au cours de la fermentation alcoolique. De plus, les résultats du séquençage par biologie moléculaire en cave, effectué à différents moments de la fermentation, ont révélé une grande variabilité microbienne parmi les conditions testées.
- Notre stratégie de bioprospection à l'aide de *Metschnikowia pulcherrima* en fermentation séquentielle a permis d'obtenir des vins de chasselas avec des arômes floraux et lactiques plus marqués sans altérer leur profil. ■

Bibliographie

- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation : The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, **181**, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- Chen, H., Liu, Y., Chen, J., Fu, X., Suo, R., Chitrakar, B., & Wang, J. (2022). Effects of spontaneous fermentation on microbial succession and its correlation with volatile compounds during fermentation of Petit Verdot wine. *LWT*, **168**, 113890. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113890>
- Combina, M., Elia, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, **99**(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. *Food Microbiology*, **28**(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Fleet, G.H.; Heard, G.M. Yeasts growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*; Fleet, G.H., Ed.; Harwood 756 Academic, Chur, Switzerland, 1993, pp. 27–54.
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez Lepe, J. A. (2018). Lachancea thermotolerans Applications in Wine Technology. *Fermentation*, **4**(3), 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Oyemitan, I.A. African Medicinal Spices of Genus Piper. In *Medicinal spices and vegetables from Africa*; Kuete, V. Ed.; Academic 741 Press, USA, 2017, pp. 581–597.
- Prior, K. J., Bauer, F. F., & Divol, B. (2019). The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-Saccharomyces yeasts associated with wine. *Food Microbiology*, **79**, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>
- Renault, P., Coulon, J., De Revel, G., Barbe, J.-C., & Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed T. delbrueckii/S. cerevisiae wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*, **207**, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., & Caballero, A. C. (2010). Influence of Candida pulcherrima Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology*, **138**(1–2), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025>
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., & Alexandre, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiology*, **32**(2), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., & Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-Saccharomyces microbial community : Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology*, **151**(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>