

UTILISATION DE *CANDIDA PYRALIDAE* DANS LES FERMENTATIONS MIXTES EN VINS BLANCS SECS

Poulard A.¹

Gaiņa B.², Moscvinteva E.³, Belova O.³

¹Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Val de Loire – Centre, Unité de Nantes
Château de la Frémoire 44120 Vertou, France

²Académie des Sciences de Moldavie, Chisinau, Moldavie

³Université Technique de Moldavie, Chisinau, Moldavie

Poulard A., e-mail: alain.poulard@vignevin.com

Summary: The recent developments in fermentation techniques through the use of sequential inoculation non-*Saccharomyces*/ *Saccharomyces* *sp.* yeasts showed the interest of expanding the aromatic range of dry white and rosé wines. *Candida pyralidae* a predominantly oxidative type of yeast has been studied. The wines produced with *Candida pyralidae* display very fruity characteristics and characterised by high levels of fatty acid esters. Further developments will involve the research of adequate conditions for the industrial production of *Candida pyralidae* in the form of cream yeast or LSA, prior to its commercial release with winemakers.

Keywords: sequential inoculation, non- *Saccharomyces*, fermentation, aromas.

Introduction

Traditionnellement, les fermentations spontanées sont toujours assurées par des levures indigènes où le genre *Saccharomyces* devient rapidement prédominant. Une amélioration visant à maîtriser les fermentations et à éviter les incidents organoleptiques, a consisté à préconiser le levurage par inoculation de souches de *Saccharomyces cerevisiae* sous forme de Levure Sèche Active (LSA). Cet objectif est atteint aujourd'hui en œnologie; toutefois, lorsque leur utilisation est généralisée, l'amélioration de la qualité observée est parfois accompagnée d'une standardisation aboutissant à une perte de typicité des produits finis. Depuis quelques années, les études menées par différentes équipes (Ciani, 1997, Ciani et etc.1998, de Llanos Frutos et etc. 2004, Bely et etc.,2008, Ehsani et etc. 2012) montrent que certaines souches de levures non-*Saccharomyces* sont responsables d'un gain organoleptique supplémentaire observé sur les vins (Moreno et etc.1991, Ferraro et etc. 2000, Languet et etc. 2005) . Utilisées en levurage séquentiel (Zott et etc. 2009), ces souches contribuent ainsi à la complexité aromatique des produits, tandis *Saccharomyces cerevisiae* permet le maintien des exigences technologiques propres au bon déroulement des fermentations. Plusieurs spécialités commerciales développées par les industriels sont maintenant proposées aux vinificateurs pour des applications technologiques différentes: production d'arômes: *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyverii*, *Metschnikowia pulcherrima*; production d'acide lactique: *Kluyveromyces thermotolerans*; dégradation de l'acide malique: *Schizosaccharomyces pombe*. Des travaux visant à inventorier de nouvelles espèces non-*Saccharomyces* susceptibles d'élargir l'horizon aromatique des vins blancs secs ont été entrepris depuis plusieurs années (Poulard et etc. 2010) à partir de la collection de l'IFV de Nantes. *Candida pyralidae* levure à caractère oxydatif dominant a été plus particulièrement étudié dans ce cadre.

Materiels et methodes

Les conditions d'acclimatation au moût de *Candida pyralidae* ont fait l'objet d'une première approche, les paramètres contrôlés concernaient la résistance à l'anhydride sulfureux (0- 10 g/hl), les concentrations initiales en sucres (132- 231 g/l) ainsi que les niveaux de pH (2,8, -4,3) à partir de milieux synthétiques puis de moûts de raisin frais. Plusieurs essais ont été ensuite réalisés au laboratoire afin d'optimiser sa croissance dans les moûts: niveau d'ensemencement, apport en oxygène, température d'acclimatation. Une fois ces conditions de développement connues, il a fallu vérifier l'efficacité de l'apport d'un levain de *Candida pyralidae* dans des conditions proches de la pratique, sur des moûts de raisin blanc neutre. Son association avec la LSA *Sacch. cerevisiae* PMD 53 par ensemencement séquentiel au 4^{ème} jour de la F.A. D'autres souches de non-*Saccharomyces* appartenant aux genres *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Metschnikowia* et *Pichia* ont été associées dans le cadre de cet essai. L'expérimentation a été réalisée en cuverie expérimentale sur 3 lots de vendanges blanches issues du cépage neutre Melon B; les raisins récoltés sont amenés à la cave sans protection particulière. Les traitements mécaniques effectués sont les suivants: égrappage - pressurage (presseur pneumatique)-débouillage et sulfitage (3 g/hl) puis addition d'enzymes pectolytiques (1g/hl). Le débouillage du moût est réalisé après une stabulation en cuve de 4 jours à 5°C. Lors du soutirage, le moût homogénéisé est transféré pour chacune des 3 séries dans 6 fûts inox de 50 l. Des contrôles analytiques portant notamment sur la richesse en sucres et la teneur en azote assimilable permettent de faire des ajustements nécessaires sur le moût afin d'obtenir des conditions de fermentation favorable

La mise en oeuvre des levains mixtes dans les trois séries suit un protocole identique. Les 4 souches non-*Saccharomyces* sont préparées sur des milieux de jus de raisin 8 jours avant leur introduction dans les moûts. A l'ensemencement, les populations avoisinent 10⁹ UFC/ml. Le témoin est ensemencé avec une souche de levure *Sacch. cerevisiae* PMD 53. A J₀ les non-*Saccharomyces* sont introduits dans les moûts débouillés avec une proportion de 2 % vol. Après 4 jours de stabulation dans le milieu, la L.S.A *Sacch. cerevisiae* PMD 53 est incorporée pour achever les fermentations alcooliques, conduites à 18°C tout au long du processus. La réussite de l'implantation des souches est vérifiée par analyse PCR de la biomasse récupérée au 4^{ème} jour de fermentation.. Une fois les sucres dégradés, un sulfitage est réalisé à raison de 6 g/hl. Les analyses classiques sont effectuées après fermentation et celles concernant les composés aromatiques avant la mise en bouteilles.

Resultats et discussion

Les essais conduits en laboratoire montrent que *Candida pyralidae* est une espèce levurienne très rustique. Résistante au SO₂ (10g/hl), elle n'est pas gênée par les concentrations importantes de sucres (231 g/l) dans les moûts et peut se développer dans des zones de pH habituellement rencontrée dans les moûts (2,8 à 3,6). Elle requiert une demande optimale en azote assimilable proche de 200mg/l avec une température idéale de 22°C. Sa croissance peut être facilitée par une addition préalable du moût en oxygène (6mg/l).

Composition du moût de raisin

Les résultats des analyses des 3 lots de moûts de raisin sont présentés dans le Tab. 1. Le moût de la série C contient une plus grande quantité de l'acide malique (5.3 g/l) que les autres lots. Pour le lot B les teneurs en acide tartrique sont significativement plus faibles (2,3g/l). Les trois moûts présentent une richesse en sucres ainsi qu'une teneur en azote assimilable (légèrement carencée) très proches.

Tab. 1 Caractéristiques de 3 lots de vendange mis en œuvre

Analyses	LOT A	LOT B	LOT C
Acide L malique (g/l)	4,9	4,8	5,3
Acide tartrique m (g/l)	4,7	2,3	4,7
Teneur en sucres (g/l)	179,3	182,5	180,9
Acidité totale (g/l H ₂ SO ₄)	5,10	4,10	5,10
Alcool probable (% vol)	11,00	11,20	11,10
pH IRTF	3,17	3,19	3,17
Azote assimilable – (mg/l)	133	128	133

Déroulement de la fermentation alcoolique

Dans les 3 situations, les souches de non-*Saccharomyces* ont été inoculées 4 jours avant l'ajout de la LSA de référence *Sacch. cerevisiae*.

Table. 2. Déroulement de la fermentation alcoolique

	LOT A	LOT B	LOT C
	Durée de la fermentation alcoolique (j)	Durée de la fermentation alcoolique (j)	Durée de la fermentation alcoolique (j)
CP	18	37	21
DH	25	37	20
MP	25	47	21
PM	21	37	20
KA	25	47	21
TEMOIN	16	30	15

Globalement, les fermentations en cultures mixtes (Tab.2) sont un peu plus lentes que celles utilisant simplement *Sacch. cerevisiae*. Les contrôles d'implantation montrent que les 5 souches se développent correctement sur les 3 lots de moûts. La composition initiale du jus (moût B: 30 NTU au débouillage) peut être tenue responsable de difficultés fermentaires rencontrées pour l'ensemble des souches. Pour les lots A et B les durées supplémentaires observées par rapport au témoin avec les cultures mixtes restent tout à fait raisonnables; elles varient de 2 à 6 jours pour *C. pyralidae*.

Composition des vins après la fermentation alcoolique

Le Tab. 3 regroupe à titre d'exemple, la composition des vins du lot B après fermentation. Les fermentations alcooliques des échantillons y compris le témoinensemencé avec la LSA ont été languissantes s'étalant de 30 à 47 jours, vraisemblablement liées à une trop faible turbidité du moût (30 NTU). Deux conséquences

directes à cet allongement du processus fermentaire ont été relevées: la présence de sucres résiduels supérieurs à 3,5g/l avec les souches LSA témoin, *M. pulcherrima* et *Kl africana* ainsi qu'une dégradation plus importante de l'acide malique avec ces deux dernières ainsi que *D. hansenii*. *C. pyralidae* donne un profil de vin équilibré pour ces deux paramètres considérés. L'élévation de l'acidité volatile est relativement faible de l'ordre de 0,05 à 0,08 g/l par rapport au témoin. La composition des vins issus des fermentations mixtes deux autres lots (A, C) reste cependant très proches des témoins élaborés avec *Sacch. cerevisiae*.

Table. 3. Composition des vins du lot B après fermentation alcoolique

LOT B	CP	DH	MP	PM	KA	TEMOIN
Acide L malique (g/l)	2,4	0,4	0,7	2,8	<0,2	3,5
Acide tartrique (g/l)	1,4	1,6	1,4	1,5	1,4	1,5
TAV (%vol)	12,20	12,30	12,10	12,20	12,00	12,00
Glucose+Fructose (g/l)	2,2	0,8	3,7	2,4	4,5	4,0
Acidité totale (g/l H ₂ SO ₄)	3,40	2,70	2,90	3,50	2,70	4,31
Acidité vol cor. (g/l H ₂ SO ₄)	0,30	0,32	0,33	0,33	0,33	0,28
pH	3,35	3,44	3,42	3,35	3,46	3,22
SO ₂ total(mg/l)	107	128	109	107	102	95

Analyses d'arômes

Les vins élaborés ont subi avant leur mise en bouteilles (mars 2012) une analyse d'arômes réalisée par chromatographie en phase gazeuse (SM/SPME). Les quantités d'acétate d'éthyle produites dans les fermentations mixtes sont raisonnables, comprises pour le Lot A entre 30 et 78 mg/l, le témoin *Sacch. cerevisiae* occupant une position moyenne (51 mg/l). 3 non- *Saccharomyces* permettent cependant d'abaisser ces teneurs entre 30 et 35 mg/l: *Candida pyralidae*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Pichia membranaefaciens*. Pour les autres molécules indésirables, aucune différence significative n'apparaît au niveau des concentrations en hexanol et cis-3 hexénol ou encore le 4-vinyl phénol. Pour le 4-vinylguaiacol toutes les modalités sont comprises entre 1 et 2,98 mg.l, *Candida pyralidae* puis *Kloeckera africana* en produisant les teneurs les plus élevées. Les concentrations en esters éthyliques à courte chaîne (propionate, isobutyrate, butyrate et 4-méthylbutyrate d'éthyle) présentées sur les Figures 3 et 4 montrent que l'utilisation de *Candida pyralidae* dans les levains mixtes en augmente significativement la proportion. La présence de *Kl. africana* et *D. hansenii* dans les levains mixtes permet à un degré moindre d'augmenter les teneurs en propionate d'éthyle par rapport au témoin. De la même manière *C. pyralidae* améliore significativement le potentiel aromatique en métabolisant d'avantage d'acétate d'isoamyle et d'acétate d'hexyle. Cette observation confirme les données déjà acquises au cours des millésimes précédents. A un degré moindre, *D. hansenii* permet également d'augmenter les concentrations de ces deux molécules dans les vins. Enfin, les levains mixtes *C. pyralidae*-*Sacch.cerevisiae* permettent également d'élever les proportions des esters éthyliques d'acides gras dans les vins, notamment l'hexanoate et l'octanoate d'éthyle. On retrouve une tendance identique avec des teneurs d'hexanoate d'éthyle croissantes sur les levains de *D. hansenii*, *P. membranaefaciens* et de *M. pulcherrima* par rapport à *S. cerevisiae*.

Analyses sensorielles

A la dégustation, les vins élaborés avec certaines souches non-*Saccharomyces* permettent d'accroître l'intensité aromatique des vins vers des notes plus fruitées et d'améliorer de manière très significative les caractéristiques gustatives des vins blancs secs dits « neutres ». Ainsi sur plusieurs millésimes *Candida pyralidae* utilisé en levurage séquentiel avec plusieurs souches commerciales de *Sacch. cerevisiae* a donné régulièrement des vins qui se distinguaient par leur potentiel aromatique élevé (notes de fruits exotiques, poire, coing) et un équilibre en bouche soutenu par une bonne sucrosité. La Figure 1 présente les résultats des examens sensoriels effectués sur les vins de Muscadet du millésime 2012.

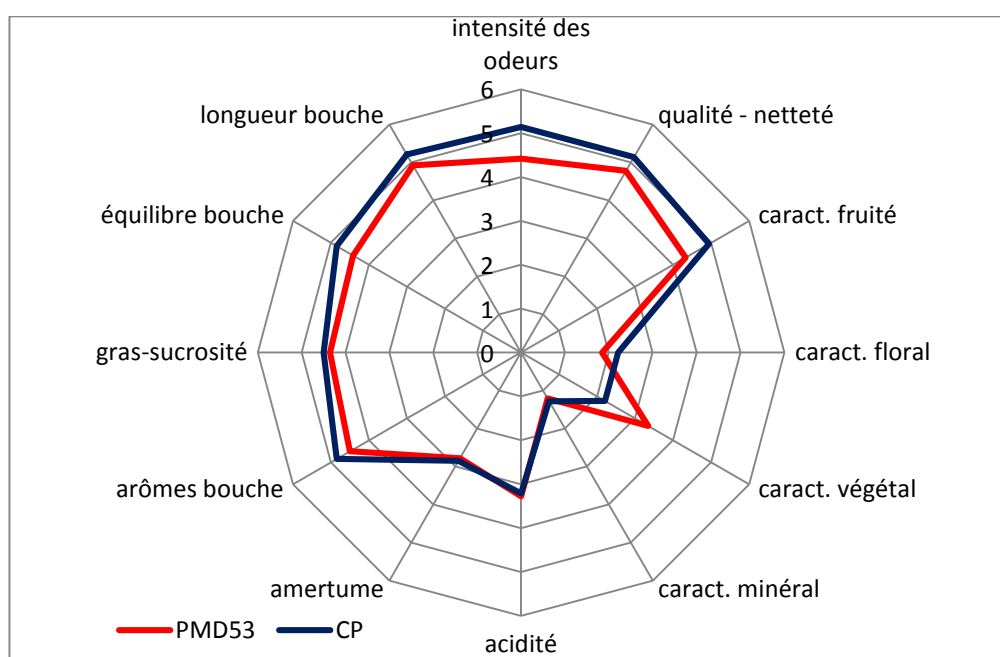


Fig. 1. Caractéristiques sensorielles des vins Témoin et issus de diverses souches de non *Saccharomyces*. Essai IFV, Melon B, 2012.

Conclusion

Dans le cadre des travaux menés sur de nouvelles souches de non-*Saccharomyces* permettant d'influencer positivement la composante aromatique des vins de cépages «neutres», *Candida pyralidae* a fait l'objet d'une attention particulière. La connaissance de ses conditions d'acclimatation dans les moûts valide la grande rusticité de cette souche peu sensible au SO_2 , aux teneurs initiales en sucres ou encore aux conditions de pH. Plusieurs essais ont été réalisés au laboratoire afin d'optimiser sa croissance dans les moûts: niveaux d'ensemencement, apport en oxygène, température d'acclimatation. Son association avec *Sacch. cerevisiae* en fermentation séquentielle qui nécessite une optimisation des teneurs en azote assimilable aboutit à des fermentations souvent un peu lentes mais toujours complètes. La composition des vins élaborés depuis plusieurs

millésimes avec cette souche ne diffère pas notablement des témoins, et la combinaison de SO₂ n'y est pas sensiblement plus importante. Cependant, la composition aromatique des vins montre un impact très intéressant de l'activité de *Candida pyralidae* se traduisant par une augmentation significative de nombreux composés (acétates, esters éthyliques d'acides gras...). Ces observations sont corrélées avec une meilleure appréciation des vins qui développent des caractères fruités plus intenses ainsi qu'un meilleur équilibre en bouche. La mise au point des conditions de production industrielle de *Candida pyralidae* sera prochainement engagée pour assurer sa diffusion commerciale.

Bibliographie

1. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarede I, Dubourdieu D, 2008. Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312-320.
2. Ciani M, 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res.Devel.Microbiol.*,1,317-331.
3. Ciani M, Ferraro L, 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 247-254.
4. De Llanos Frutos, R., Fernandez-Espinar, M. T, Querol, A, 2004. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85, 175-185.
5. Ehsani M, Renault P, Puente V, 2012. L'impact organoleptique de *Torulaspota delbrueckii* en conditions œnologiques lors d'une inoculation séquentielle avec *Saccharomyces cerevisiae*. *Revue des œnologues*, 143, 23-26.
6. Ferraro L, Fatichenti F, Ciani M, 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Bioch.*, 35 (2000) 1125-1129.
7. Gonzalez S, Barrio S E, Querol A, 2007. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology* 102.
8. Languet P, Ortiz-Julien A, Aguera E, Samson A, Salmon J.M, 2005. Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. *Revue des Œnologues*. 117, 31-33.
9. Moreno J.J, Millan C, Ortega J.M, Medina M, 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.*, 7:181-190.
10. Poulard A, Gaina B, Coarer M, Cibotari E, Burusciuc T 2010. Mise en œuvre de levures non-*Saccharomyces* en levains mixtes dans les fermentations œnologiques. XXXIIIème Congrès Mondial du Vin . OIV, Tbilissi.
11. Zott E, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I, 2009. Les levures non-*Saccharomyces*. Dynamique et caractérisation durant les étapes pré-fermentaires et la fermentation alcoolique. *Revue des œnologues*, 133, 11-12.