

VIGNERONS BIO  
NOUVELLE AQUITAINE

---

# Projet Biocontrol

Développement d'outils pour  
la réduction /suppression du SO<sub>2</sub> en fermentation

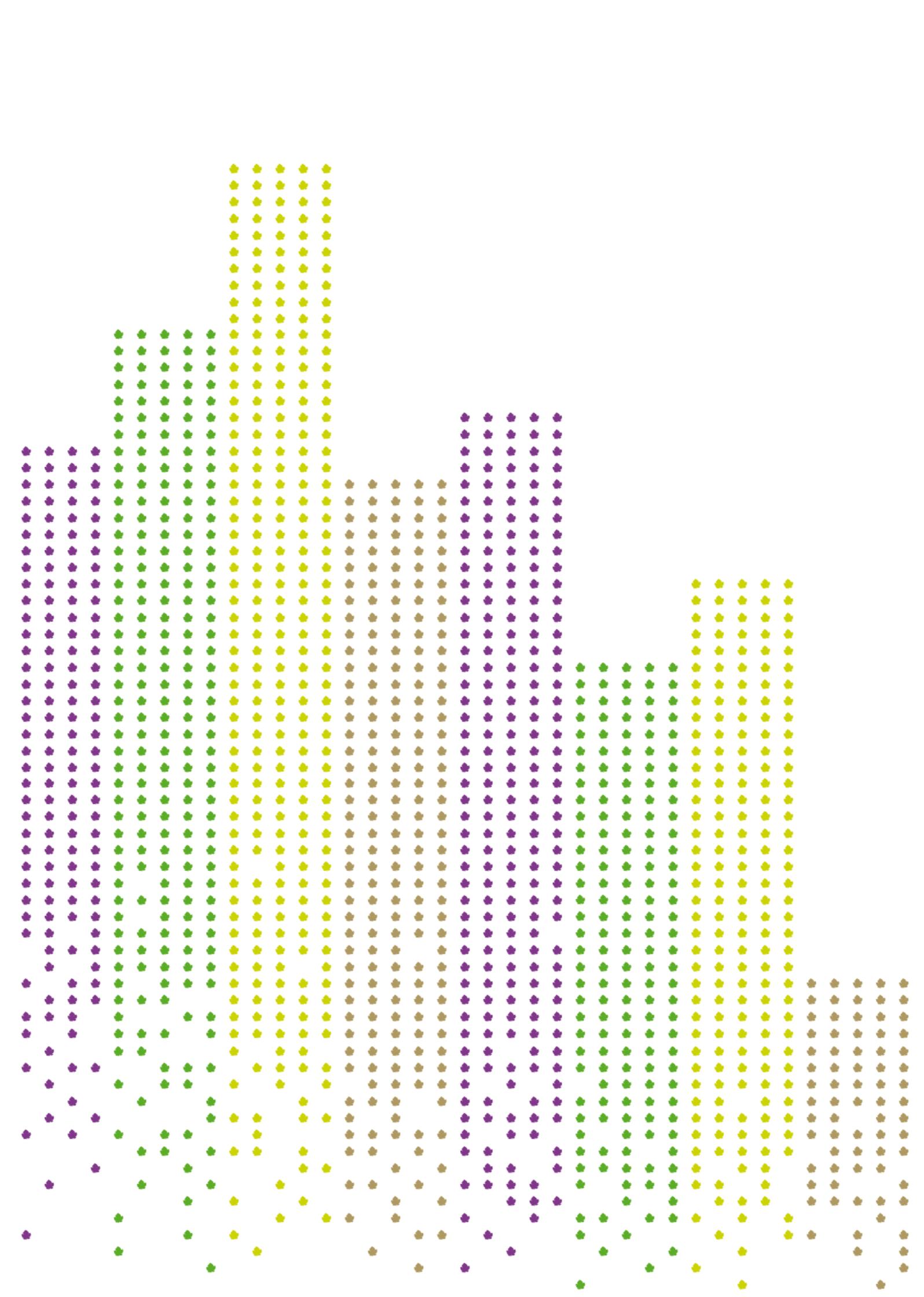


Edition 2018

Avec le soutien de:



Fonds Européen Agricole pour le Développement Rural (FEADER):  
l'Europe investit dans les zones rurales



## SOMMAIRE

- 01 Présentation des partenaires
- 02 Contexte
- 03 La Bioprotection
- 04 Présentation du projet
- 05 Résultats
- 06 Conclusion
- Bibliographie

## Sommaire

Ce projet, dont le but est d'évaluer différentes modalités permettant de réaliser des vinifications sans SO<sub>2</sub>, se base sur l'évaluation de l'utilisation de préparations de BioProtection en phases préfermentaires et pendant la fermentation alcoolique.

Ce procédé, qui utilise des levures Non-Saccharomyces pour coloniser le milieu en début de fermentation en remplacement du SO<sub>2</sub>, se développe beaucoup ces dernières années sur le plan commercial. Toutefois, peu de travaux scientifiques ont étudié cette pratique pour l'instant. Les connaissances scientifiques sur le sujet sont faibles.

Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine a collaboré avec l'ISVV pour réaliser ce pré-projet. Ce dernier bénéficie d'un accompagnement de l'Europe et de la Région Nouvelle-Aquitaine. Les conclusions intermédiaires que permet de dresser le projet BIOCONTROL seront affinées dans le cadre d'une nouvelle étude, déposée en 2018.

*Nous remercions l'Europe et la Région Nouvelle-Aquitaine pour leur soutien financier.*

*Nous remercions l'ensemble des partenaires qui ont contribué à la réalisation de ce projet.*

*Nous remercions particulièrement les exploitations viticoles qui ont participé à ce projet et se sont beaucoup impliquées pour un bon déroulement des expérimentations.*



UNION EUROPÉENNE  
FONDS EUROPÉEN AGRICOLE  
POUR LE DÉVELOPPEMENT RURAL



RÉGION  
Nouvelle-  
Aquitaine



Fonds Européen Agricole pour le Développement Rural (FEADER) :  
l'Europe investit dans les zones rurales

# >01 Les partenaires

---



L'unité de recherche œnologie développe depuis de nombreuses années des travaux de recherche finalisés, associant à la fois une recherche fondamentale de haut niveau scientifique et le développement de connaissances innovantes et pratiques pour la filière vitivinicole.

Son thème central consiste en la réalisation de travaux permettant de contribuer à la préservation et à la valorisation de la qualité du vin. L'unité de recherche organise son activité en 3 axes : Axe 1 - molécules d'intérêt biologique, Axe 2 - qualité et identité du vin (chimie, biochimie, analyse sensorielle et procédés) et Axe 3 - Microorganismes : diversité, métabolismes, sélection (microbiologie).

L'étude des microorganismes du vin constitue une activité récurrente du laboratoire, associée à l'axe 3 microbiologie, qui développe depuis de nombreuses années des approches intégratives alliant écologie, génomique et physiologie. Ces travaux de recherche visent notamment à décrire les communautés microbiennes, levures et bactéries de la baie du raisin au vin, et les facteurs d'impact sur ces communautés, en vue d'une maîtrise des fermentations et d'une amélioration de la qualité des vins. Ces travaux de recherche permettent d'enrichir la collection de microorganismes du vin du laboratoire (Centre de Ressources Biologiques, CRB OENO).



Microflora est une cellule de transfert de technologie en microbiologie de l'ISVV, associée à l'Axe 3 de recherche (microorganismes : diversité, métabolismes, sélection).

Créée en 2004, elle est adossée au laboratoire de Microbiologie de l'Unité de Recherche en Œnologie de l'ISVV. Microflora permet aux professionnels d'avoir accès aux dernières avancées issues de la recherche scientifique, notamment par le biais d'études personnalisées.

Le rôle de la cellule de transfert dans ce projet est d'assurer une partie des analyses microbiologiques notamment celles portant sur les essais conduits en microvinifications à l'ISVV puisque ce sont des techniques d'analyse qui ont été optimisées par la cellule de transfert afin d'être proposées aux viticulteurs. La cellule a également un rôle primordial dans l'interprétation des résultats de ces essais grâce à son expertise sur ces nouvelles pratiques. Microflora est également impliquée dans l'interprétation et les conclusions de ces essais ainsi que dans la communication et la diffusion des résultats.

## Domaine du Bourdieu

Situé dans la région viticole de l'Entre Deux Mers, le vignoble Boudon compte 27 hectares de vignes situés sur deux communes, Soullignac et Targon. En agriculture biologique depuis deux générations, le domaine est également très impliqué dans les structures départementale et régionale accompagnant l'agriculture biologique et viticole. Patrick Boudon, à la tête actuellement du vignoble, a été président du CIVAM Bio Gironde et de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine (anciennement Syndicat des Vignerons Bio d'Aquitaine). Il est également membre du conseil d'administration d'Inno'vin.

Ce domaine est largement impliqué dans les projets de recherche. Il a, par exemple, participé, par l'intermédiaire de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine, au CASDAR Levains Bio (projet national sur la fermentation indigène) et au CASDAR SECURBIO sur la contamination pesticide. Le domaine échange régulièrement avec les partenaires de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine que sont l'IFV ou l'ISW.

Le domaine a été sélectionné pour sa capacité à faire des blancs et des rouges ainsi que la possibilité de réaliser des essais en barriques pour les blancs et en gros volume pour les rouges.

## Château Carbonnieux

Le domaine de Carbonnieux représente 170 hectares de terres situés aux portes de Bordeaux. 50 hectares sont dédiés aux cépages rouges (60% Cabernet Sauvignon, 30% Merlot et 7% et 3% le Cabernet Franc et Petit Verdot respectivement) et 42 hectares sont plantés en cépages blancs (65% Sauvignon Blanc et 35% Sémillon).

Château Carbonnieux est membre de la première association SME (Système de Management Environnemental) de Bordeaux, certifiée ISO 14001. L'ensemble du personnel du château Carbonnieux est engagé dans cette démarche qualité.

Le château a été sélectionné pour réaliser les essais en blanc, pour sa capacité à gérer d'inertage des blancs et à réaliser des micro-vinifications en barrique.

## Château La Conseillante

Le vignoble qui bénéficie d'un terroir unique, à dominante d'argile, est planté pour 80% de Merlot. Les 20% restant, plantés sur graves, sont du Cabernet-Franc.

Viticulture raisonnée, maîtrise des rendements, recherche de maturité optimale, tri sévère, replantation, tous ces soins apportés à la vigne bénéficient d'un outil de vinification parcellaire.

La Conseillante s'est, en effet, doté d'installations performantes et modernes dont un nouveau cuvier qui permet une vinification « sur mesure » des 18 micro-parcelles réparties sur les 12 hectares de la propriété.

Le château a été sélectionné pour réaliser les essais en rouge et pour sa capacité à réaliser des micro-vinifications en barriques.

## >02 Le contexte

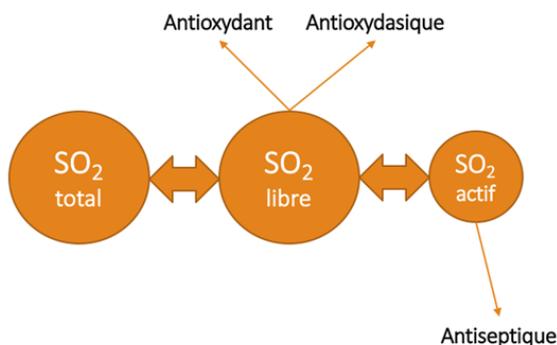
### Rôle des sulfites dans le vin

L'utilisation du dioxyde de soufre en œnologie s'est généralisée depuis la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle. Combinant de nombreuses propriétés, cet auxiliaire s'est très vite imposé, pour devenir indispensable à la pratique des chais (Ribéreau-Gayon, 2004). Principal agent antiseptique, il inhibe de façon transitoire, lorsqu'ajouté à la vendange, le développement des bactéries et dans une moindre mesure les levures. Au cours de la conservation des vins, il s'oppose au développement de tous les microorganismes, permettant ainsi d'éviter des altérations microbiennes.

Antioxydant, il combine l'oxygène dissous en présence de catalyseurs.

Il a aussi un effet antioxydasique : il inhibe les enzymes d'oxydation de type tyrosinase du raisin sain ou laccase pour les vendanges altérées.

### Effet du dioxyde de soufre sur les communautés microbiennes



Dans le vin, le dioxyde de soufre est en équilibre sous forme libre et combinée. La forme active en tant qu'agent antimicrobien, directement liée au pH du vin et à sa constitution, est le SO<sub>2</sub> moléculaire.

Sous cette forme, le SO<sub>2</sub> pénètre dans la cellule avec pour conséquences i) une altération de la membrane, ii) une réaction avec des métabolites intracellulaires et iii) une chute de la concentration intracellulaire en ATP entraînant la mort cellulaire

(Revue dans Divol et al., 2012). Avec le réchauffement climatique, le pH des vins tend globalement à augmenter ce qui limite fortement l'efficacité du SO<sub>2</sub> en réduisant la part de sa fraction active à dose de sulfitage équivalente.

Utilisée en phase préfermentaire, la pratique du sulfitage présente un effet sur les populations microbiennes qui est plus important en vinification en blanc qu'en rouge, et se traduit par un retard dans le démarrage de la fermentation alcoolique (Takahashi et al., 2014). Le sulfitage précoce de la vendange permet d'obtenir des populations maximales de *S. cerevisiae* plus élevées (Constanti et al., 1998 ; Albertin et al., 2014) tout en limitant, au contraire, le développement des populations de non-Saccharomyces. L'addition de 50 mg/L serait suffisante pour inhiber la plupart des levures non-Saccharomyces du jus de raisin tout en sélectionnant *S. cerevisiae* (Henick-Kling et al., 1998). Ainsi un effet négatif du sulfitage sur les populations maximales de *Hanseniaspora* suivi de leur déclin plus rapide lors de la fermentation a été mis en évidence (Andorrà et al., 2008 ; Albertin et al., 2014 ; Takahasi et al., 2014). Au niveau intra espèce, la sensibilité aux sulfites dépend également de la nature de la souche considérée. Ainsi, certaines souches de *S. cerevisiae* sont relativement tolérantes de même que pour *Zygosaccharomyces bailii* (Divol et al., 2006 ; Nardi et al., 2010).

Des études récentes rapportent également l'existence de souches de *Brettanomyces bruxellensis*, principale levure d'altération des vins rouges, tolérantes aux sulfites et capables de réaliser une croissance aux doses de SO<sub>2</sub> moléculaire préconisées pour prévenir l'altération des vins (0,6 mg/L) (Curtin et al., 2012 ; Vigentini et al., 2008). L'existence de ces souches tolérantes aux sulfites, en lien avec des itinéraires techniques basés sur un sulfitage répété à des doses élevées, pose la question de la pérennité de l'utilisation systématique de cet agent antiseptique en œnologie et précise l'urgence à s'orienter vers des solutions alternatives.

Concernant les bactéries, l'effet inhibiteur du SO<sub>2</sub> sur les populations de bactéries lactiques est rapporté par de nombreux auteurs (Carr et al., 1976 ; Lafon- Lafourcade et al., 1983 ; Andorrà et al., 2008 ; Takahasi et al., 2014). Contrairement aux levures, la forme combinée présente également un effet inhibiteur vis à vis des bactéries lactiques, jouant un rôle de protection efficace en retardant leur intervention jusqu'à l'achèvement de la fermentation alcoolique. L'espèce *O. oeni* responsable de la fermentation malolactique est particulièrement sensible aux sulfites, et serait même plus sensible que des espèces telles que *Lactobacillus hilgardii* or *Pediococcus pentosaceus* (Manca de Narda and Strasser de Saad, 1987). Cette constatation a conduit les industriels à sélectionner des souches d'*O.oeni* tolérantes aux sulfites pour l'inoculation des vins. Néanmoins, l'utilisation du SO<sub>2</sub> peut engendrer des difficultés de démarrage et de gestion de fermentations malolactiques, qu'elles soient spontanées ouensemencées. Enfin, l'impact du sulfitage de la vendange sur les bactéries acétiques n'est pas clairement établi. Des travaux récents, utilisant les nouvelles techniques de séquençages, mettent en évidence des populations élevées de bactéries acétiques et lactiques dans les fermentations spontanées à faibles teneurs en sulfites, pouvant jouer un rôle antagoniste vis à vis de *S. cerevisiae* avec pour conséquence une augmentation de la durée de fermentation (Bokulich et al., 2015). Une autre étude montre, au contraire, que l'addition du SO<sub>2</sub> n'a pas d'effet sur les populations de bactéries acétiques (Andorrà et al., 2008). Néanmoins les travaux s'accordent sur la nécessité de réduire leur population initiale.

### *Effet du dioxyde de soufre contre l'oxydation chimique et enzymatique des moûts et des vins*

Dans les moûts, les phénomènes d'oxydation sont rapides puisqu'ils sont liés à la présence d'enzymes endogènes du raisin (polyphénol oxydases) ou exogènes (laccase, dans le cas de vendages altérées par la pourriture grise, *B. cinerea*). Le dioxyde de soufre, par son action antioxydasique limite très fortement ces phénomènes par un effet inhibiteur du fonctionnement des enzymes d'oxydation (Nikolantonaki et al. 2012). C'est, entre autre, par ce mécanisme que le SO<sub>2</sub> protège les moûts de l'oxydation avant leur départ en fermentation.

## Le pouvoir antioxydant du dioxyde de soufre

Le pouvoir antioxydant du dioxyde de soufre est largement reconnu en œnologie. Au cours de l'élevage au contact du bois de chêne et du vieillissement en bouteille des vins, il est acquis que de nombreuses réactions chimiques sont à l'origine de l'évolution aromatique du produit. Ces mécanismes impliquent la présence concomitante de dioxygène et de polyphénols et la réaction est catalysée par la présence de métaux de transitions tels le cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et le fer ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) qui, au final, donnent naissance à des espèces très réactives (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène ou des radicaux libres. Ces dernières espèces chimiques vont à leur tour être capables d'oxyder les composés responsables de l'évolution aromatique des vins. La présence de dioxyde de soufre dans le milieu permet d'une part, par une réaction chimique lente de combiner l'oxygène dissous et surtout, d'autre part, de piéger les formes réactives de l'oxygène (ROS), permettant au final de protéger le vin d'une évolution oxydative de ses arômes. Ainsi, cette protection du vin vis-à-vis des phénomènes oxydatifs doit permettre une évolution de ses arômes au cours du vieillissement en bouteille vers des nuances caractéristiques reflétant l'expression du cépage et d'un terroir ; on parle alors du bouquet de vieillissement des vins (Picard et al. 2015; Floch et al. 2016; Pons et al. 2016). De nombreux travaux s'accordent pour affirmer que ce type de vieillissement préserve les arômes variétaux dont certains sont particulièrement sensibles au phénomène d'oxydation ; tels les thiols volatils, contribuant à l'arôme variétal de nombreux vins blancs et rouges en leur conférant des notes de fruit frais (Bouchilloux et al. 1998; Tominaga et al. 1998; Tominaga et al. 2000; Tominaga et al. 2003; Nikolantonaki et al. 2010; Nikolantonaki et al. 2012; Nikolantonaki and Waterhouse 2012; Rigou et al. 2014).



### Rôle des sulfites dans le vin

Les sulfites jouent un rôle sur le processus de vinification et sur l'élevage.

Pour le vin blanc, le plus important est la protection vis à vis de l'oxydation. Une quantité d'oxygène excessive peut marquer le profil sensoriel du vin : les vins plutôt terpéniques sont moins sensibles à l'oxygène que les vins de type thiol.

Pour le vin rouge, le risque d'oxydation n'est pas aussi important mais la stabilité microbiologique doit être conservée. Maîtriser *Brettanomyces* et les populations bactériennes revêt une importance majeure dans la conservation des vins pour éviter les défauts dans le vin.



## >03 Bioprotection



Le développement des baies influe sur l'augmentation des populations de levures. Au fur et à mesure de l'avancée des stades phénologiques de la vigne, les espèces de levures oxydatives laissent la place aux levures fermentaires. Les levures oxydatives ne transforment pas, ou très peu, les sucres contenus dans le raisin en alcool. La levure *Saccharomyces cerevisiae* n'est généralement détectée sur baies qu'à partir du stade de la récolte.

A l'encuvage, les changements physico-chimiques provoqués par l'éclatement des baies (augmentation de la concentration des sucres, de la pression osmotique, acidité des jus et diminution de l'oxygène) vont favoriser le développement des populations *Saccharomyces* et la diminution drastique de certaines populations de levures dites Non-*Saccharomyces*.

Les levures fermentaires peuvent être séparées en 2 catégories : les levures du genre *Saccharomyces* et les Non-*Saccharomyces*. Les levures Non-*Saccharomyces* sont présentes, dans la grande majorité, principalement en début de fermentation car elles sont, pour la plupart, sensibles à l'augmentation de la teneur en alcool. Après quelques jours, ces espèces sont donc supplantées par le genre *Saccharomyces* qui assure alors la plus grande partie de la fermentation alcoolique. Les levures Non-*Saccharomyces* peuvent cependant réapparaître de manière sporadique à l'occasion de diverses opérations de vinification : remontage, aération, chaptalisation.

C'est donc à la fois l'apport de  $SO_2$  mais surtout une implantation massive de *Saccharomyces*, soit avec un pied de cuve, soit avec des LSA qui va orienter le développement et l'expression des levures Non-*Saccharomyces* en début de fermentation. Les levures Non-*Saccharomyces* apportent des profils différents, source de complexité des vins pour certains et défaut et dégradation de la pureté de l'arôme fruité pour d'autres.

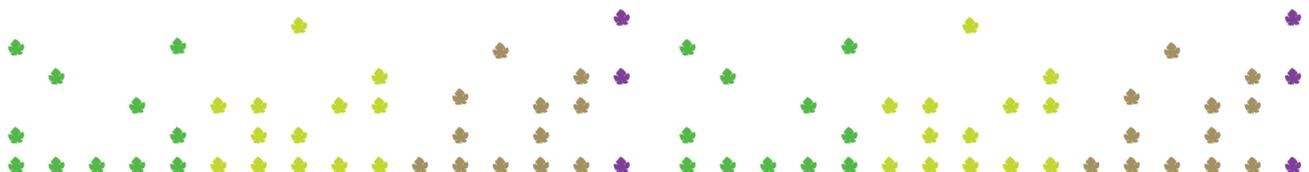
Depuis quelques années, ce groupe de levure connaît un regain d'intérêt, auprès des centres de recherche et des praticiens. Pourtant leur diversité génétique est mal connue, de même que leur diversité phénotypique. Cependant grâce au développement de nouveaux outils comme l'analyse des marqueurs microsatellites, de nouvelles avancées concernant l'impact des levures Non-*Saccharomyces* sur les caractéristiques des vins ont été obtenues.

En dehors de l'intérêt démontré de certaines espèces de levures Non-*Saccharomyces* dans le développement d'une complexité des vins dans des travaux de recherche, c'est la partie « BioProtection » de ces dernières qui va nous intéresser dans cette étude.



De nombreuses spécialités Commerciales de levures *Non-Saccharomyces* existent sur le marché (liste non exhaustive):

Fabricant/ Fournisseur	Nom commercial	Composition
AEB/ Oenolia conseil	Primaflora vins Blancs	<i>Mélange Saccharomyces/Torulasporea delbruckii</i>
AEB/ Oenolia conseil	Primaflora vins Rouges	<i>Mélange Saccharomyces/Metschnikowia pulcherrima</i>
AEB/ Oenolia conseil	Levulia Torula	<i>Torulasporea delbruckii</i>
AEB/ Oenolia conseil	Levulia Pulcherrima	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
AEB/ Oenolia conseil	Levulia Alcomeno	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
Agrovin	Viniferm Ns TD	<i>Torulasporea delbruckii</i>
Deveze Biotech Oeno	Uvarome TD	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
ICV	Levure œnologique ICV Tandem	<i>Mélange Saccharomyces/Torulasporea delbruckii</i>
IOC	Level2 TD	<i>Mélange Saccharomyces/Torulasporea delbruckii</i>
IOC	Levure IOC Gaia	<i>Metschnikowia fructicola</i>
CHR Hansen	Prelude	<i>Torulasporea delbruckii</i>
CHR Hansen	Frootzen	<i>Pichia kluyverii</i>
CHR Hansen	Melody	<i>Mélange Torulasporea delbruckii/ Kluyveromyces thermotolerans/ Saccharomyces</i>
CHR Hansen	Concerto	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
Laffort	Zymaflore Alpha	<i>Torulasporea delbruckii</i>
Laffort	Zymaflore égide	<i>Mélange Torulasporea delbruckii/ Metschnikowia pulcherrima</i>
Lallemand	Biodiva	<i>Torulasporea delbruckii</i>
Lallemand	Flavia	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Oenofrance	Levuline Symbiose	<i>Mélange Saccharomyces/Torulasporea delbruckii</i>



# >04 Projet

Le projet BIOCONTROL a pour objectif d'évaluer l'impact et l'efficacité de différents itinéraires de vinification sans SO<sub>2</sub>, dont des préparations industrielles de « BioProtection » à base de levures Non Saccharomyces :

**Objectif 1** : Impact sur la communauté microbienne de la vendange et du moût en particulier les microorganismes d'altération

**Objectif 2** : Impact sur l'oxydation des moûts et des vins

**Objectif 3** : Impact sur la fermentation alcoolique, paramètre de fermentation, analyse chimique des vins finis; Impact aromatique sur vins blancs et rouges

**Objectif 4** : Impact sur les populations de bactéries lactiques et les fermentations malolactiques

Une modalité sans SO<sub>2</sub> servira de témoin.

Pour la partie Bioprotection, l'étude porte sur un mélange de levures Saccharomyces et Non-Saccharomyces s'utilisant pendant les phases préfermentaires, avant le pressurage ou sur la machine à récolter.

Pour le vin blanc, on a *Torulaspora delbrueckii* comme principal Non-Saccharomyces et *Metchnikowia pulcherrima* pour le vin rouge. Elles sont capables de s'implanter et de coloniser le milieu.

Concernant les non-Saccharomyces, *Torulaspora delbrueckii* est utilisée pour le vin blanc, *Metchnikowia pulcherrima* pour le vin rouge. Ces deux espèces sont capables de s'implanter et de coloniser le milieu.

Une modalité avec un ensemencement précoce de saccharomyces est également étudiée.

Des essais ont été mis en œuvre en micro vinification à l'ISVV afin d'être en conditions contrôlées et de pouvoir tester différentes modalités en duplicatas. Ils ont également été réalisés en conditions réelles dans des exploitations avec des profils différents. Afin d'étudier un plus large spectre de viticulteurs, des propriétés avec des profils différents ont été choisies.

Lors de ce projet, les données que nous avons recueillies lors de projets antérieurs ont été utilisées. Il s'agit notamment des projets suivants:

CASDAR LevainsBio	WildWine
<p>« Améliorer la qualité des vins et des cidres biologiques obtenus par l'utilisation des levures et bactéries indigènes »</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Analyser génétiquement les microorganismes indigènes pour déterminer si s'ils sont représentatifs d'un terroir</li><li>Proposer solutions techniques pour permettre utiliser ces microorganismes indigènes (pieds de cuve, sélections)</li></ul> <p>Protocoles de micro-sélections et micro-production, mais pas de diffuser les souches</p>	<p>(Multi-strain Indigenous Yeast and Bacterial starters for "Wild-ferment" Wine production)</p> <p>« Évaluer et exploiter la diversité des levures et bactéries indigènes pour développer de levains originaux d'une région pour produire « vins de terroir »</p> <p>Combiner <i>Saccharomyces</i> avec Non-<i>Saccharomyces</i></p>



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT  
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale « Développement agricole et rural »



SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME

Sauvignon Blanc

- 2x {
- Sulfitage 5gr/HL
  - 5gr/HL Primaflora VB avant pressurage
  - Zéro ajout
  - 5gr/HL Zymaflore X5 avant pressurage

mini cuve de 4,5L

Zymaflore X5 20gr/HL

## Modalités

Des essais ont été réalisés en conditions contrôlées en mini vinification à l'ISVV, en propriété sur des volumes intermédiaire et en grand volume.

Enfin d'obtenir des résultats probants les modalités ont été dupliquées sauf dans le cas des grands volumes où cela est plus compliqué.

### Château La Conseillante

Vin rouge

### Château Carbonnieux

Vin blanc

### Château du Bourdieu

Vin blanc

Vin rouge

#### Cépage

Merlot

Sauvignon Blanc

Sauv. Gris

Merlot

#### Modalités

2x

- Sulfitage 3 gr/HL
- 5gr/HL Primaflora VB sur mout
- Zéro ajout
- LSA

2x

- Sulfitage 5gr/HL
- 5gr/HL Primaflora VB avant pressurage
- Zéro ajout
- 5gr/HL Zymaflore X5 avant pressurage

1x

- Sulfitage 5gr/HL
- 5gr/HL Primaflora VB sur moût

1x

- Sulfitage 3gr/HL
- 5gr/HL Primaflora VR sur moût

#### FA

8 Barriques 400 hl

8 Barriques (250L)

2 Cuves ciment 60 HL

2 Cuves inox 110 HL

#### Lévurage

Excellence XR 15 gr/HL

Zymaflore X5 20 gr/HL

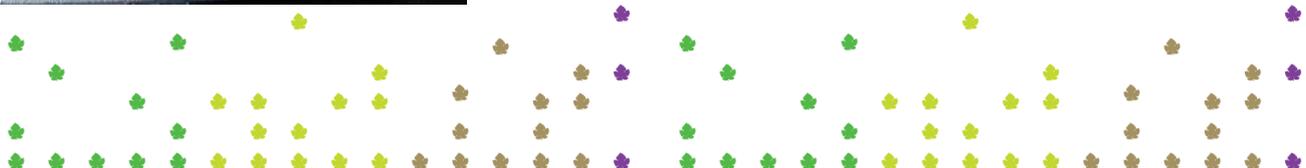
Zymaf. X5 20gr/HL

Fermol Rouge à 15 gr/HL

## Prélèvements



	Blanc	Rouge
1	Pressurage	Encuvage après homogénéisation
2	Après débouillage	Jour+2
3	Début-FA	Début-FA
4	Mi-FA	Mi-FA
5	Fin-FA	Fin-FA



# 300 boîtes de culture/château

## Analyses

Chaque échantillon

- 3x Dilutions différentes
- 5x Milieux différents pour sélectionner et amplifier une partie de colonies en particulier
  - NS, NSA, NSB: Non-Saccharomyces
  - LT: Levures Total
  - BA, BL: Bactéries Acétiques et Lactiques
- Analyses chimiques

Sur le moût après encuvage/après pressurage (si vin blanc ou rouge) et sur le vin en fin-FA, des échantillons ont été prélevés pour réaliser des analyses chimiques.



Contrôle d'implantation

Sur moût	Degrés potentiels, densité, pH, acidité totale, azote assimilable
Sur vin (fin-FA)	Degré alcoolique, pH, acidité totale, acidité volatile, SO <sub>2</sub> total

## Identification d'espèces

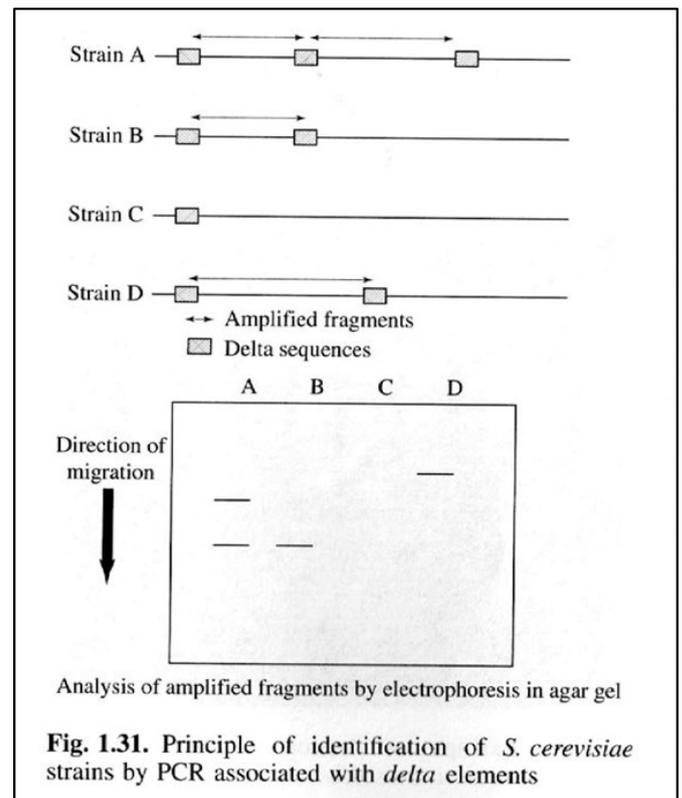
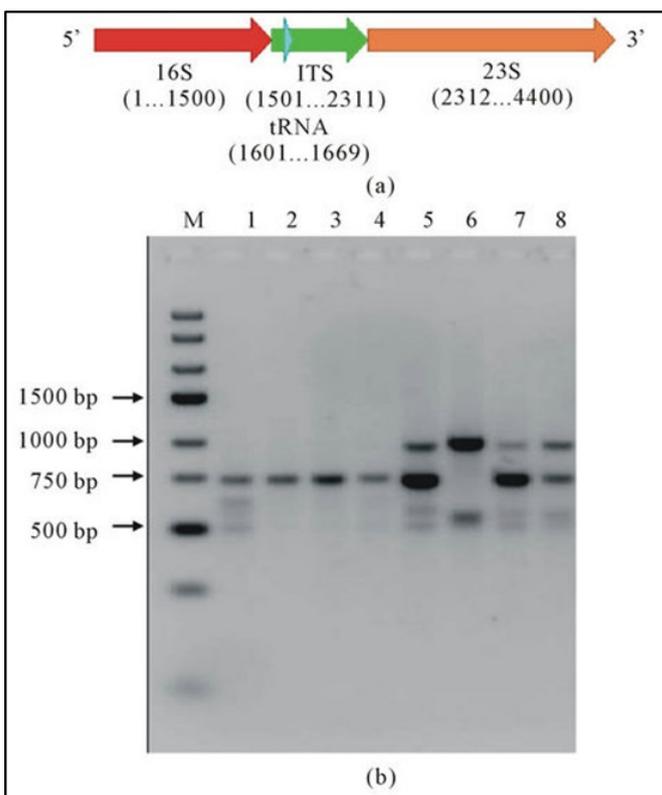


Fig. 1.31. Principe of identification of *S. cerevisiae* strains by PCR associated with *delta* elements

Objectif: savoir si la souche correcte de *S. cerevisiae* s'est implantée  
 PCR-delta → différenciation souches *Saccharomyces cerevisiae* (régions delta)

Objectif: connaître la diversité microbologique du moût (espèces)  
 PCR-ITS « Internal Transcribed Transfer » à différenciation espèces des levures (amplification rDNA)

# >05 Résultats



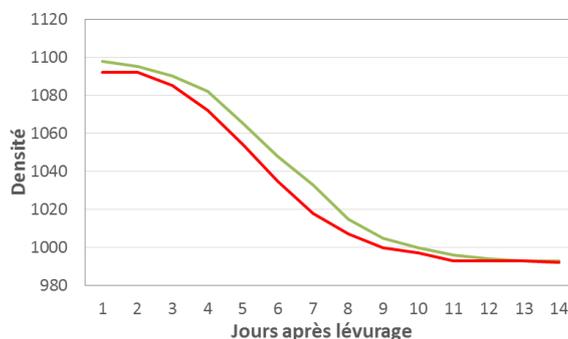
## Courbes de Fermentation

Elles sont similaires entre les différentes modalités. Il en va de même des analyses chimiques des vins (TAV, pH, Acide malique et IPT).

L'essai sur le Domaine du Bourdieu sert surtout à une mise en application en grands volumes.

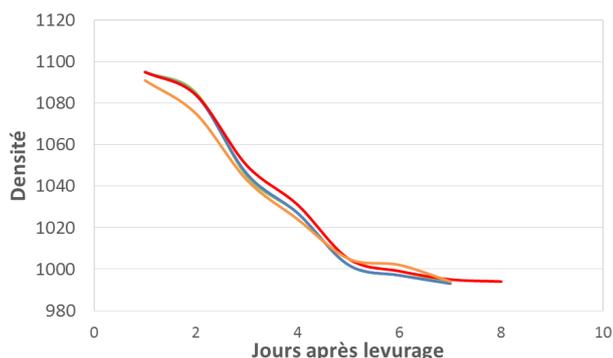
### Domaine du Bourdieu Rouge

	TAV
<b>BioProtection moût</b>	13,8
<b>Sulfitage</b>	13,9



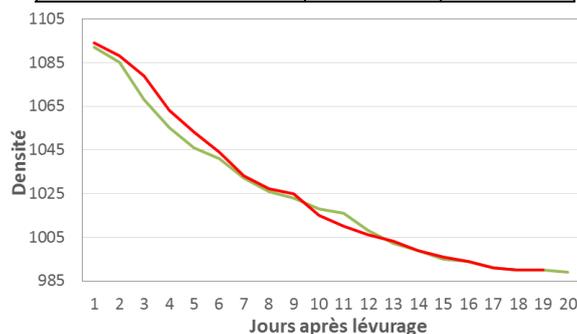
### Château Carbonnieux

	TAV	pH	AM
<b>0 ajouts</b>	13,54	3,38	2,1
<b>BioProtection moût</b>	14,8	3,41	2,1
<b>LSA X5</b>	14,14	3,4	2,1
<b>Sulfitage</b>	14,13	3,36	2,3



### Domaine du Bourdieu Blanc

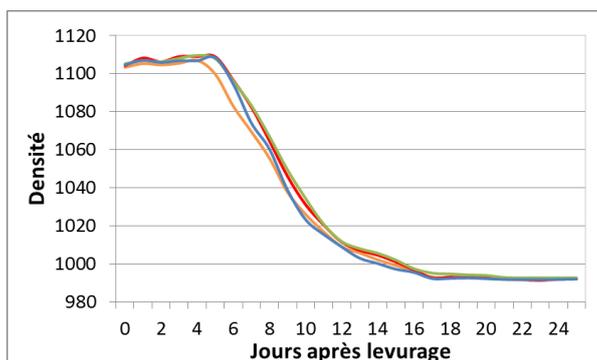
	TAV	AM
<b>BioProtection moût</b>	13,6	2,2
<b>Sulfitage</b>	13,4	2,6



On note une fermentation assez longue, qui traîne, pour les vins blancs du Domaine du Bourdieu.

### Château La Conseillante

	TAV	pH	IPT
<b>0 ajouts</b>	14,9	3,59	86
<b>BioProtection moût</b>	14,805	3,555	90,5
<b>LSA XR</b>	14,9	3,58	88,5
<b>Sulfitage</b>	14,91	3,51	87,5



Au niveau des analyses chimiques, au Château Carbonnieux, on note une grande variation des degrés et un degré très élevé pour la modalité BioProtection.

Au Château La Conseillante la modalité BioProtection montre un démarrage plus tardif par rapport aux autres modalités.

## Bactéries acétiques

Nous ne constatons pas de grandes différences entre les modalités sur les niveaux de populations de bactéries acétiques. Au niveau des acidités volatiles, les valeurs sont correctes pour la majorité des essais. Elles sont cependant élevées au domaine Du Bourdieu, notamment sur la modalité BioProtection moût.

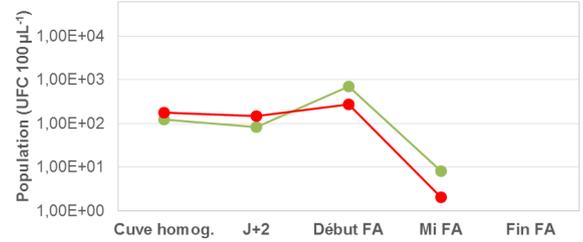
### Domaine du Bourdieu Blanc

	AV
<b>BioProtection moût</b>	0,52
<b>Sulfitage</b>	0,40



### Domaine du Bourdieu Rouge

	AV
<b>BioProtection moût</b>	0,33
<b>Sulfitage</b>	0,34

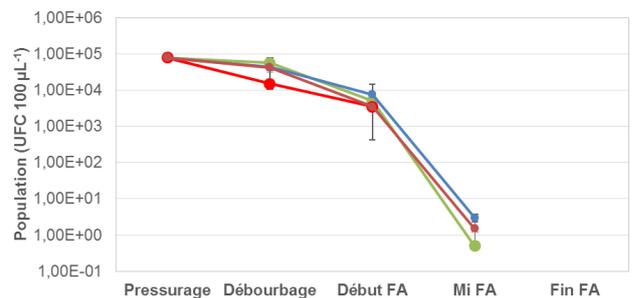


Au Domaine du Bourdieu Blanc, nous observons des remontées des populations des bactéries acétiques. Ces bactéries ont besoin d'oxygène pour se développer, c'est la raison pour laquelle elles sont stressées et peu actives lors la fermentation alcoolique (milieu réducteur, pauvre en oxygène). L'explication de la remontée vient sans doute du ralentissement de la FA observé sur la courbe de fermentation.

Au château Carbonnieux, la modalité sans sulfites a un niveau en bactérie acétique significativement plus élevé (stade début FA) et un niveau de volatile plus élevé. Les autres modalités sont identiques.

### Château Carbonnieux

	AT	AV
<b>0 ajouts</b>	4,18	0,24
<b>BioProtection moût</b>	4,05	0,19
<b>LSA X5</b>	4,1	0,19
<b>Sulfitage</b>	4,13	0,13

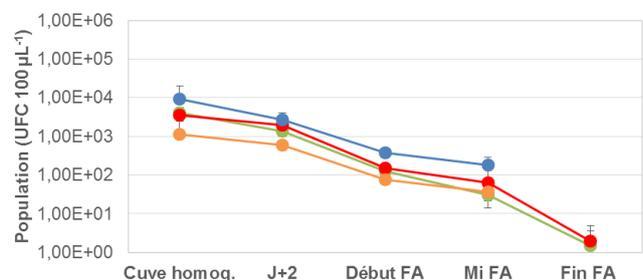


Au Château La Conseillante les acidités volatiles sont assez proches et la modalité avec zéro ajout présente de meilleurs résultats que les autres. La modalité LSA a la volatile la plus élevée. Ce qui est confirmé par une population significativement plus élevée sur la modalité zéro ajout à J+2 alors que les autres modalités sont dans des niveaux similaires.

### Château La Conseillante

	AT	AV
<b>0 ajouts</b>	4,55	0,280
<b>BioProtection moût</b>	4,75	0,345
<b>LSA XR</b>	4,45	0,355
<b>Sulfitage</b>	4,75	0,315

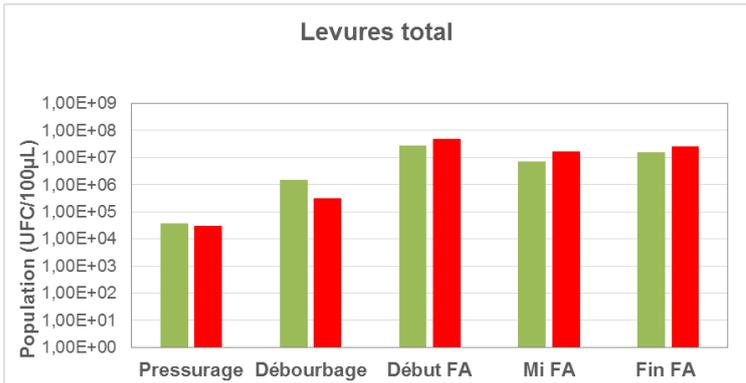
### Château La Conseillante



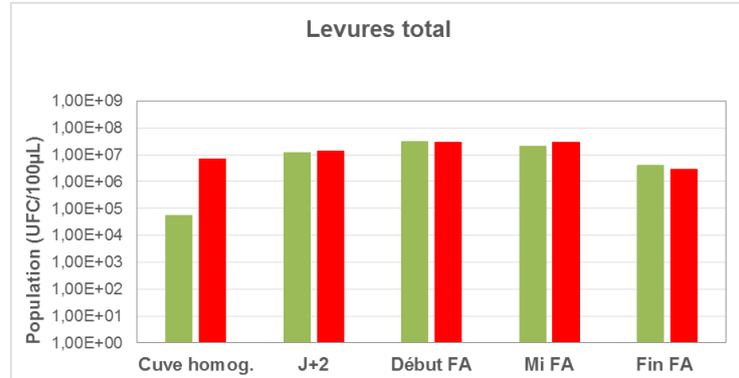
## Levures Total

Nous trouvons des dynamiques de populations des levures total classiques. On note des niveaux de départ très différents de population entre blanc et rouge. Ce qui semble logique, les blancs étant plus homogènes du fait qu'ils sont en phase liquide alors que les rouges sont en phase solide.

### Domaine du Bourdieu Blanc

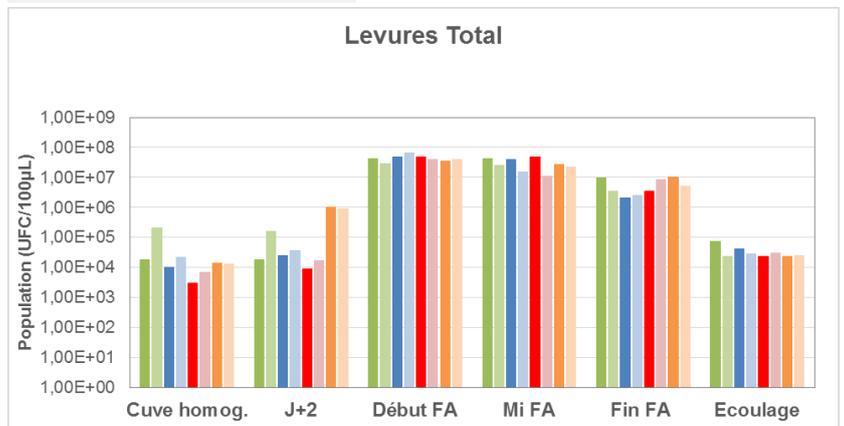


### Domaine du Bourdieu Rouge

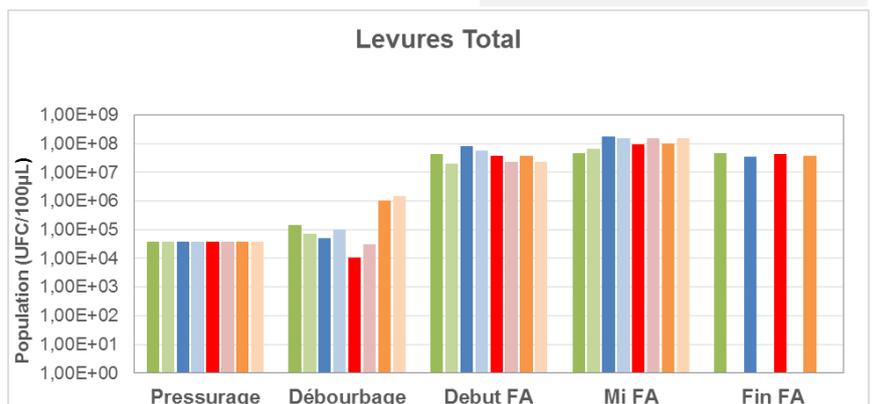


Les modalités sulfitées subissent une diminution des levures total, ce qui est logique et les modalités LSA une augmentation plus rapide, ce qui est dû à une implantation plus précoce de saccharomyces plus adaptées au milieu.

### Château La Conseillante



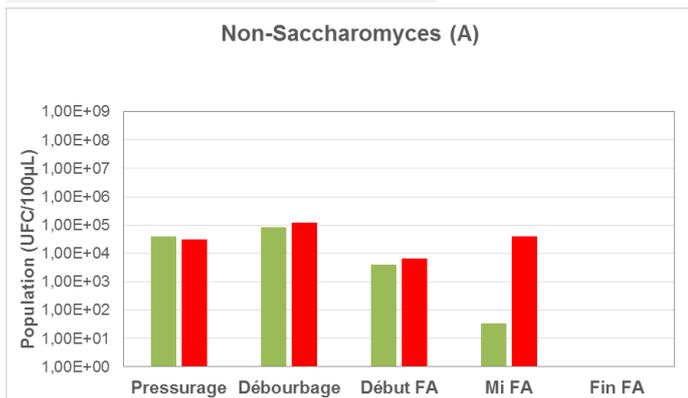
### Château Carbonnieux



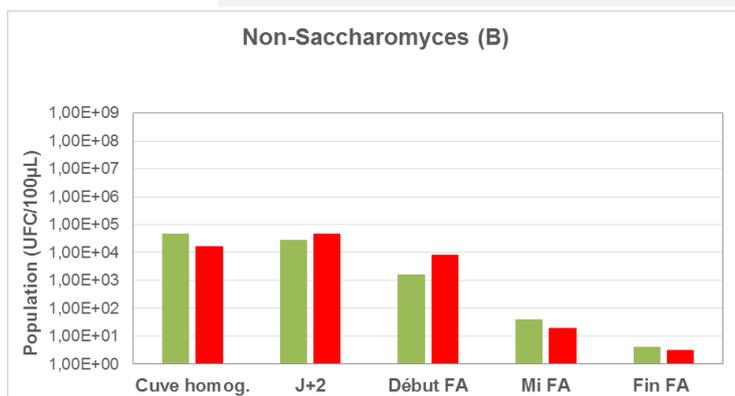
## Levures Non-Saccharomyces

Nous constatons des populations de levures Non-Saccharomyces plus importantes au pressurage (vin blanc) et à la cuve d'homogénéisation (vin rouge) sur les modalités Bioprotection. Cela correspond à l'ajout de Bioprotection (levures Non-Saccharomyces pour coloniser le milieu).

### Domaine du Bourdieu Blanc

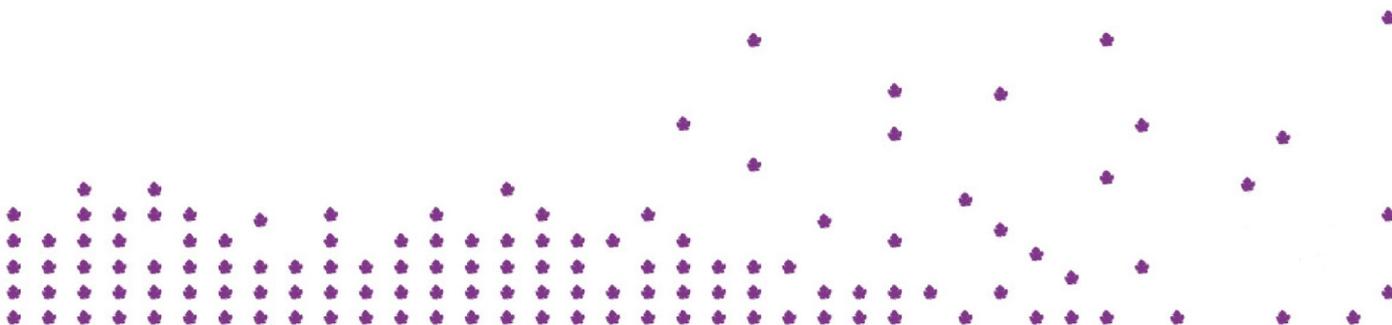


### Domaine du Bourdieu Rouge

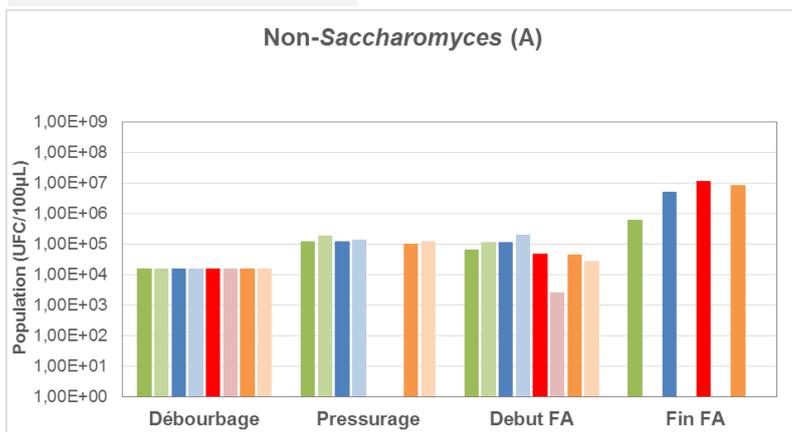


Pour le Domaine du Bourdieu, l'évolution des rouges est normale avec une diminution progressive des Non-Saccharomyces. On note les très bons comportements de la levure non saccharomyces de la Bio protection avec une population qui augmente plus et qui diminue dans le temps pour laisser les saccharomyces faire la fermentation.

Le cas des blancs est plus délicat, notamment pour les blancs sulfités où les non saccharomyces restent plus longtemps et à des niveaux élevés. C'est pourtant cette modalité qui a l'AV la plus faible.



### Château Carbonnieux



Les niveaux de population au Château Carbonnieux sont homogènes au départ puisque nous travaillons sur vin blanc et donc sur jus.

La progression des non-saccharomyces en modalité Bioprotection malgré l'ensemencement reste faible.

Pas de différences de populations liées à l'ajout de Bioprotection Primaflora ou LSA X5 sur milieu NS.

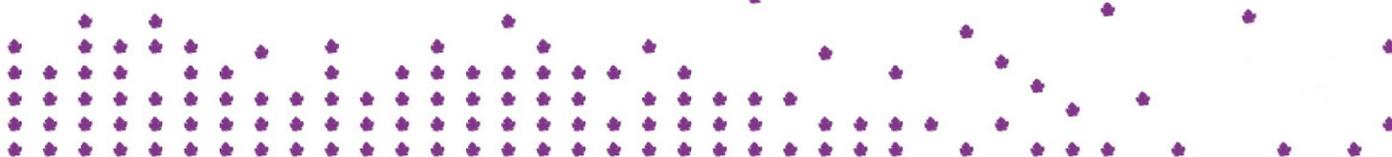
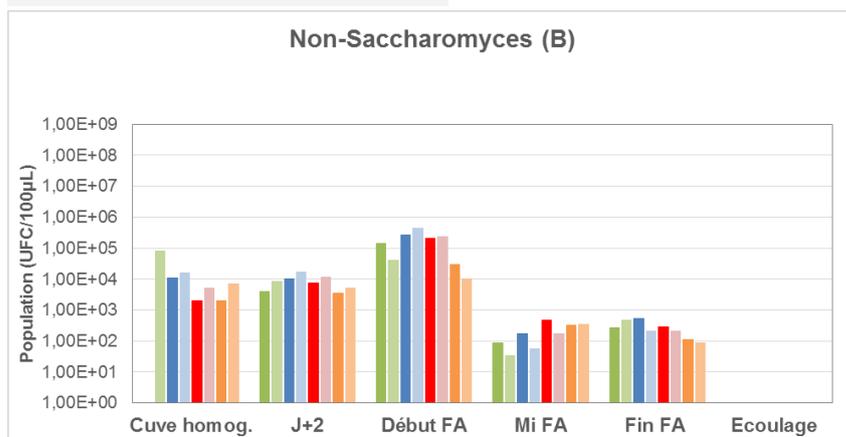
La remontée des populations en fin de FA est plus faible avec la modalité Bioprotection.

*Remarque: les données de pressurage nul et fin de FA correspondent au fait que l'analyse n'a pu être effectuée*

Les résultats du dénombrement microbiologique montrent un effet significatif sur population Non-Saccharomyces au début FA dans les modalités Bioprotection et LSA XR.

Par contre, nous trouvons des populations plus élevées pour les modalités zéro ajouts et sulfitée au cours de la fermentation.

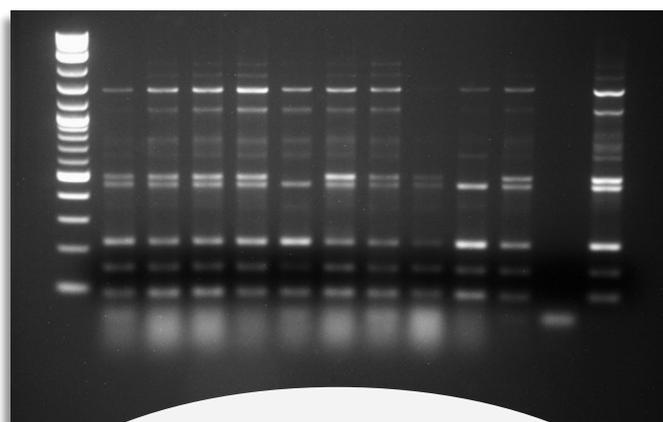
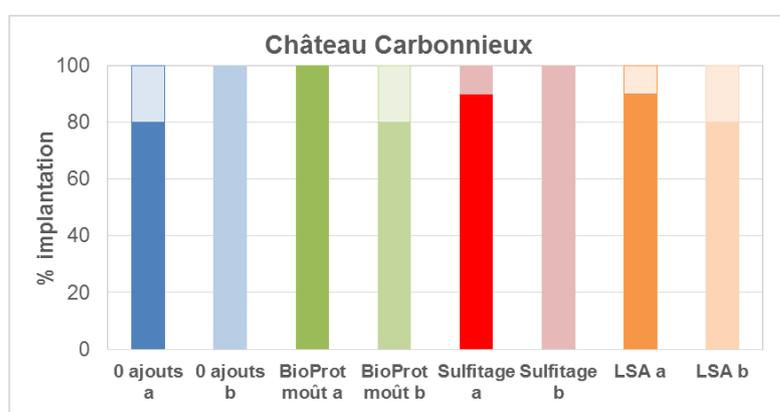
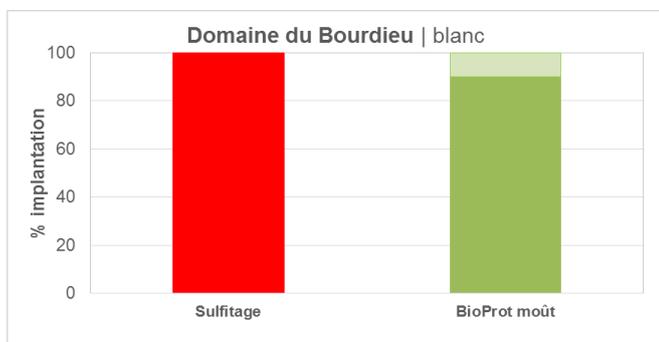
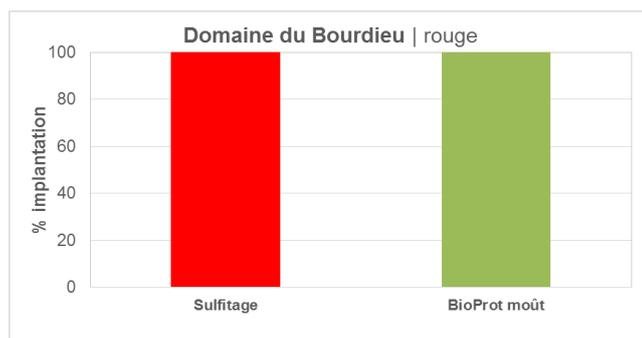
### Château La Conseillante



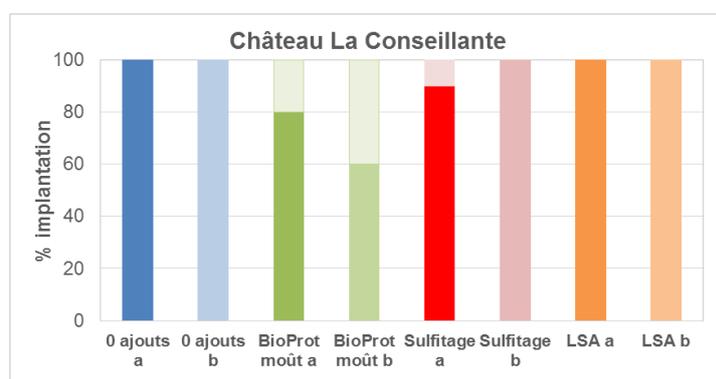
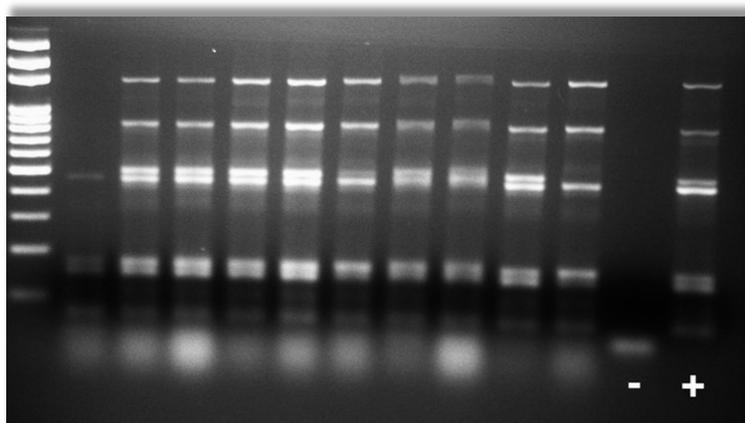
## Contrôle d'implantation

Globalement, la souche de *Saccharomyces cerevisiae* inoculée par levurage s'est implantée dans le milieu sauf pour une des modalités au Château La Conseillante.

■ BioProt moût a   ■ BioProt moût b   ■ 0 ajouts a   ■ 0 ajouts b  
 ■ Sulfitage a   ■ Sulfitage b   ■ LSA a   ■ LSA b



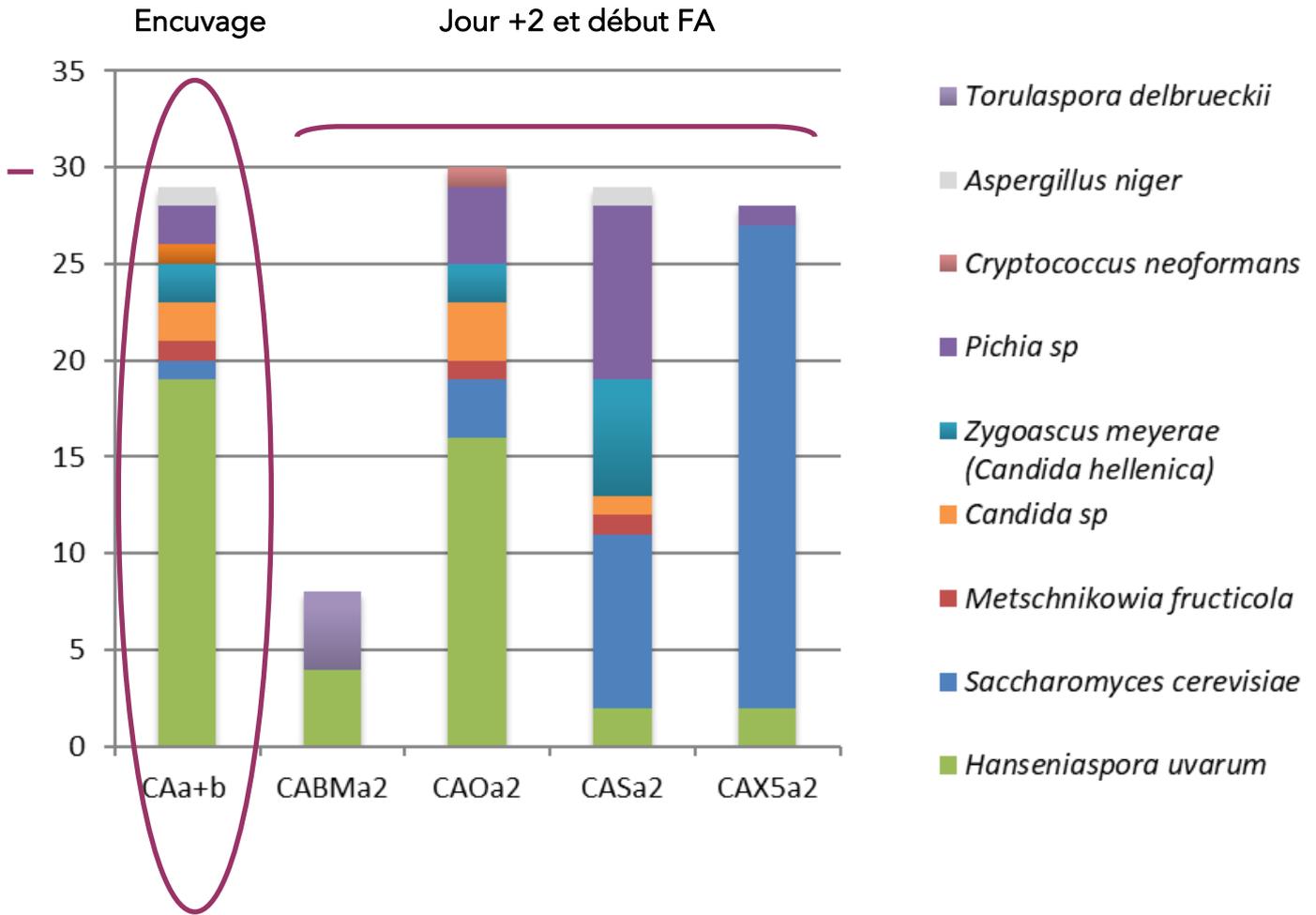
Au Château Carbonnieux, nous avons un pourcentage d'implantation entre 80% et 100% selon les clones que nous avons pris pour le test.



Au Château La Conseillante, nous trouvons un pourcentage d'implantation entre 60% et 80% dans la modalité Bioprotection. Cette mauvaise implantation sur les 2 répétitions de la modalité Bioprotection pouvant expliquer le retard au démarrage de la fermentation que nous avons constaté.

L'explication vient sans doute en partie de la présence d'un mélange sach/non sach dans la Bioprotection. La saccharomyces présente dans la Bioprotection ayant perturbé la saccharomyces utilisée pour la fermentation.

Château Carbonnieux

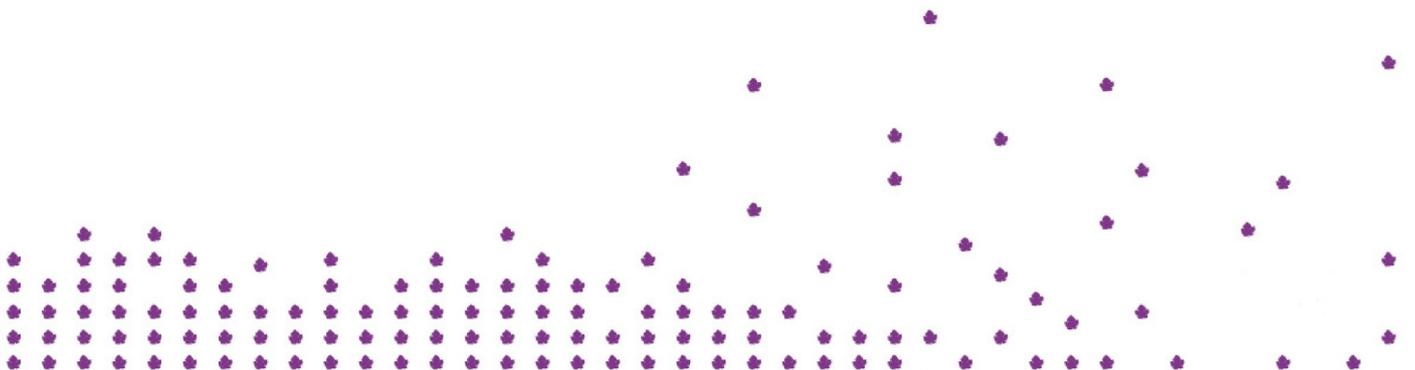


Malgré un nombre de colonies analysé trop faible pour valider les conclusions, 50% des colonies sont identifiées à *Torulaspora delbrueckii* sur la modalité Bioprotection.

L'ajout de SO<sub>2</sub> favorise le développement des *Saccharomyces cerevisiae* (Modalité sulfite).

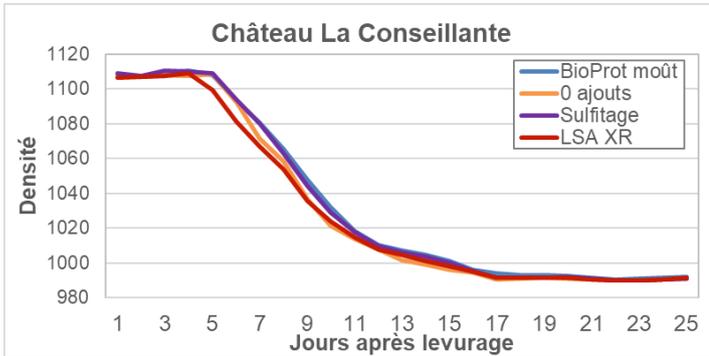
Sur la modalité LSA X5, la population des *Saccharomyces cerevisiae* est majoritaire .

La présence de *Hanseniaspora uvarum* est limitée à l'ajout de SO<sub>2</sub> ou de LSA X5 et dans une moindre mesure avec la Bioprotection.



# Analyse MiSeq ADNr 16S et 18S sur échantillons

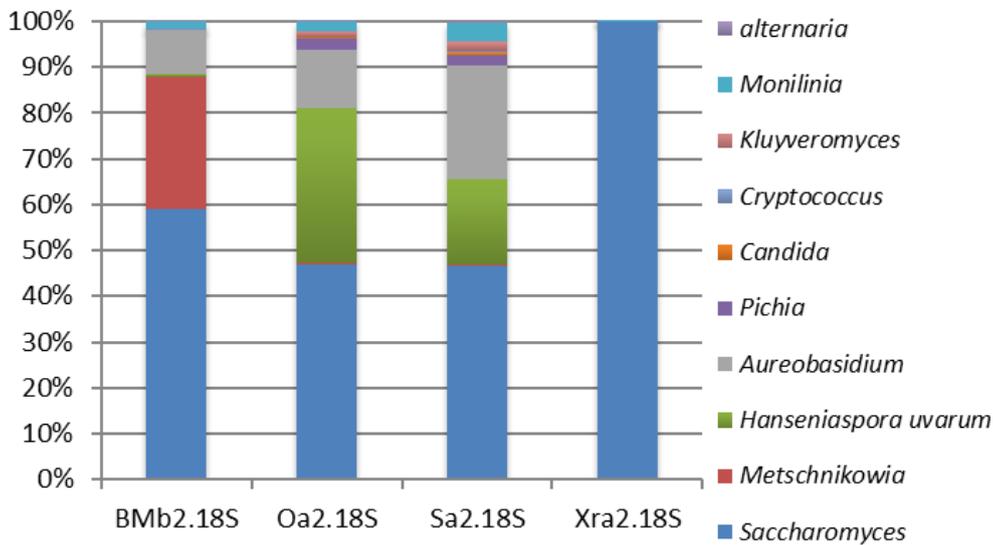
## Château La Conseillante



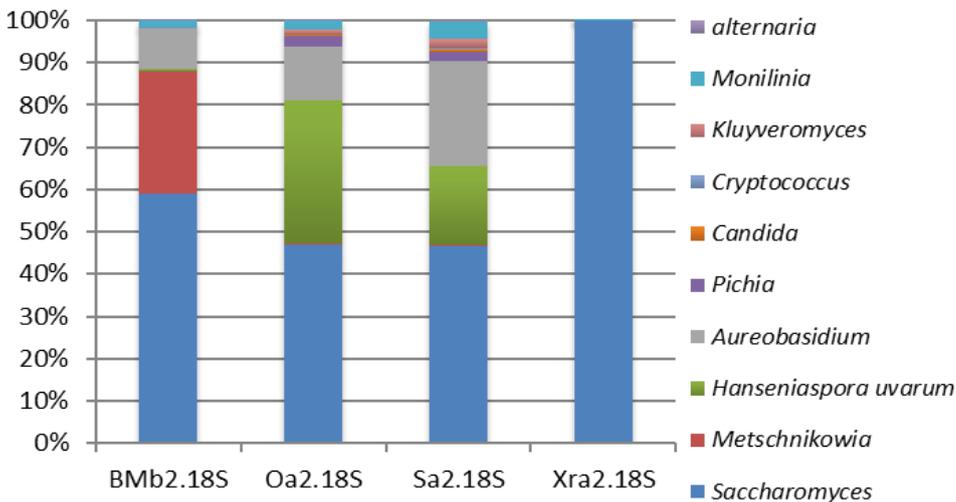
Rouge	
Encuvage après homog.	J 0
Jour + 2	J+3
Début-FA	J+6
Mi-FA	J+1
Fin-FA	0

J 0  
J+3  
J+6  
J+1  
0  
J+1  
7  
J+2  
1

## Encuvage



## Jour+2 et début FA



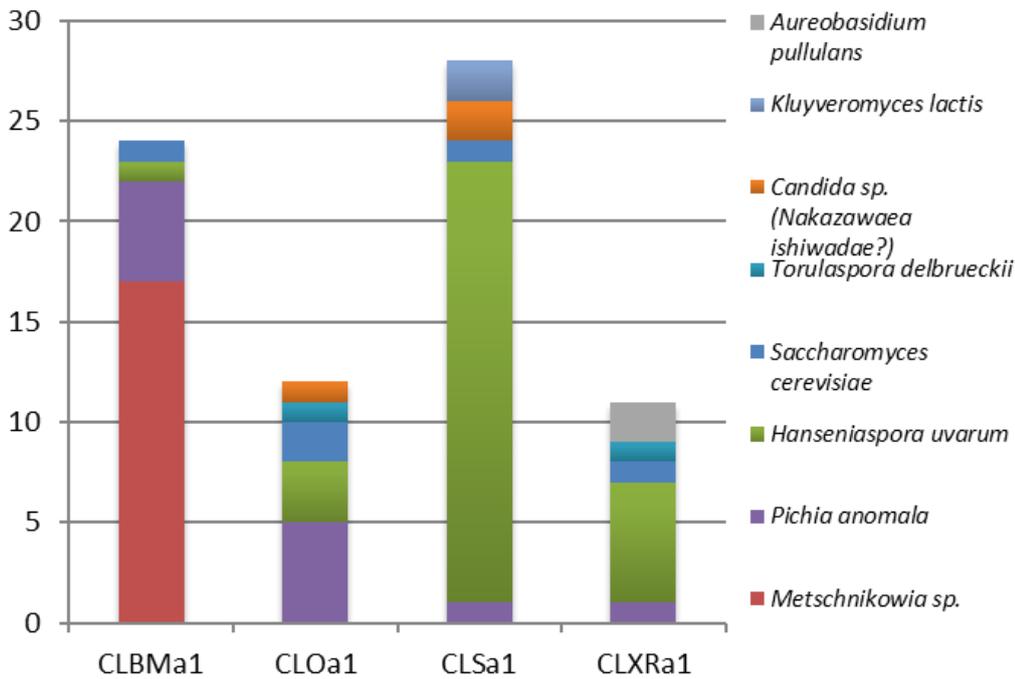
Comme attendu, les espèces *Metschnikowia* et *Saccharomyces cerevisiae* sont présentes dans la modalité Bioprotection et occupent la niche.

Après 2 jours de macération préfermentaire, *S.cerevisiae* est présente, et même dominante dans la modalité Bioprotection.

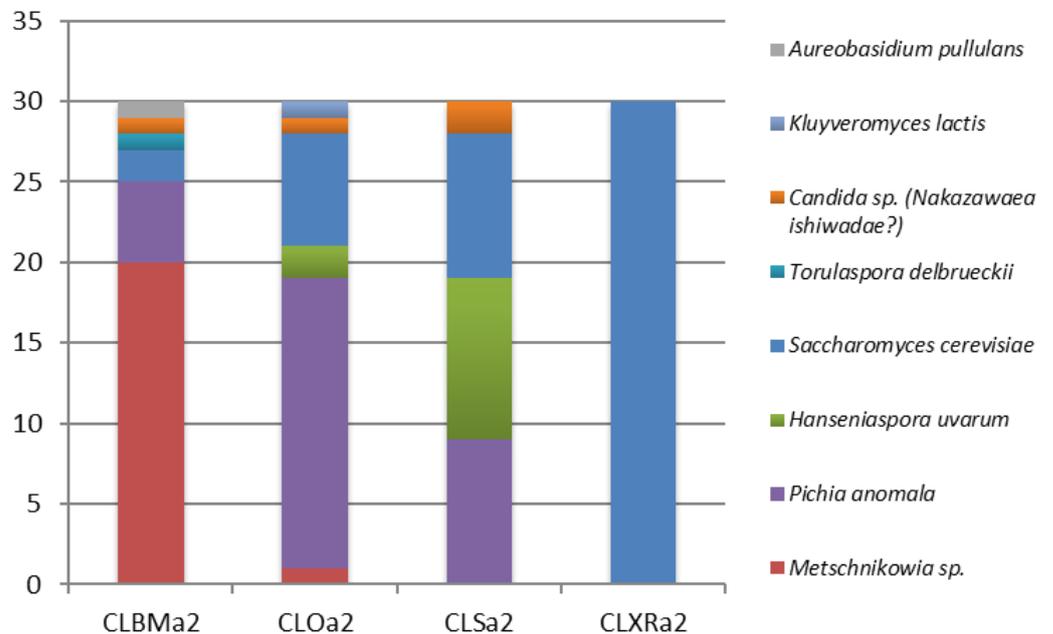
## Analyse des colonies isolées sur LT; PCR/ ITS/ Séquençage

Château La Conseillante

### Encuvage



### Jour+2



Comme attendu, et en accord avec les données de séquençage, *Metschnikowia* est présente dans la modalité Bioprotection et occupe la niche, mais *Saccharomyces* n'est pas retrouvée. *H.uvarum* est dominante dans la modalité sulfitée et LSA XR.

Après 2 jours de macération préfermentaire, *S.cerevisiae* est présente, et même dominante dans la modalité LSA XR. *Metschnikowia* est toujours présente dans la modalité Bioprotection.

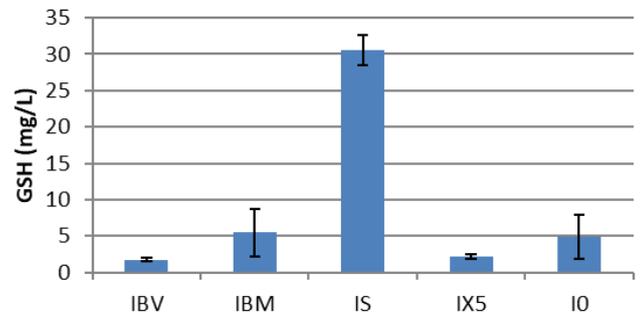
## Analyses chimiques, blanc

Le glutathion (GSH), marqueur de l'oxydation des moûts et des vins a été analysé au débouillage et en fin de fermentation pour les essais menés à l'ISVV et au Château Carbonnieux.

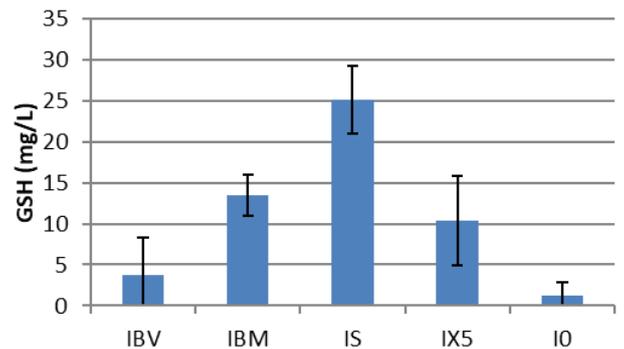
Au débouillage, une grande quantité de glutathion est perdue avec ou sans Bioprotection. La modalité sulfitée présente des niveaux significativement plus élevés en GSH par rapport aux autres modalités pour les deux expérimentations.

En fin de fermentation, les teneurs élevées en GSH pour les modalités Bioprotection semblent montrer le rôle positif de la Bioprotection vis à vis de la conservation ou du relargage du GSH.

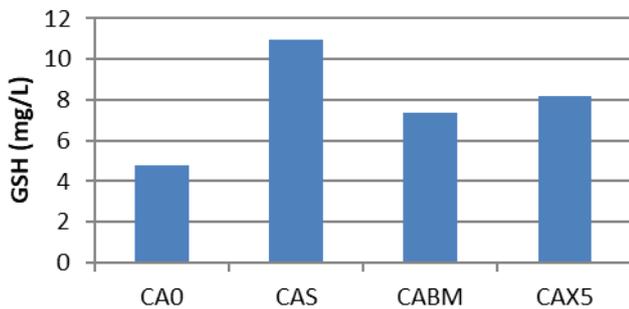
ISVV-Débouillage (point 2)



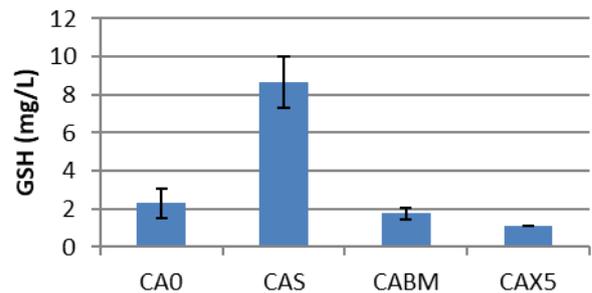
ISVV-Fin FA (point 5)



Carbonnieux-fin FA (point 5)

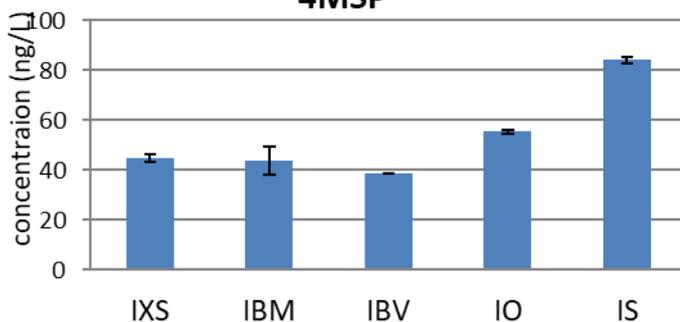


Carbonnieux-Débouillage (point 2)

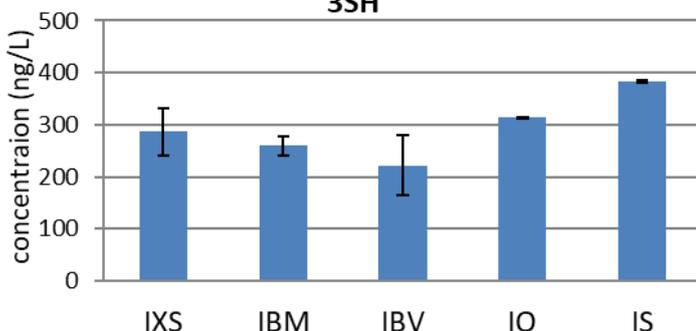


## Thiols volatils ; exemple ISVV

4MSP



3SH



## Analyses chimiques, blanc

Les thiols volatils, marqueurs de la typicité aromatique du Sauvignon blanc ont été dosés en fin de fermentation pour les essais menés à l'ISVV et au Château Carbonnieux.

La modalité sulfitée présente des niveaux significativement plus élevés en thiols volatils par rapport aux autres modalités. Quelle que soit l'expérimentation, les teneurs en thiols volatils sont impactées de manière identique en absence de SO<sub>2</sub> et en présence ou non de Bioprotection.

## Dégustation

Des tests triangulaires ont été réalisés sur 2 dégustations afin de voir si l'on pouvait distinguer les modalités entre elles.

### Domaine du Bourdieu Blanc

Test triangulaires:  
Modalités B/S, test significatif .

### Domaine du Bourdieu Rouge

Test triangulaires:  
Modalités B/S, pas de différences significatives.

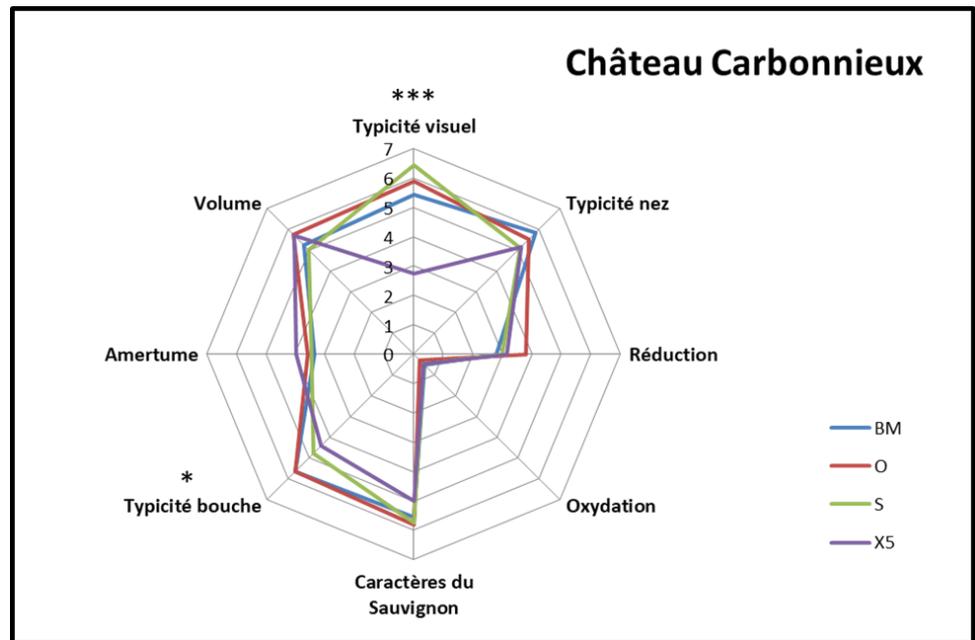
Au Domaine du Bourdieu les tests triangulaires montrent des différences significatives entre la modalité sulfitée et la modalité BioProtection pour le vin Blanc.

Sur vin Rouge, nous ne trouvons pas de différences significatives entre les deux modalités.

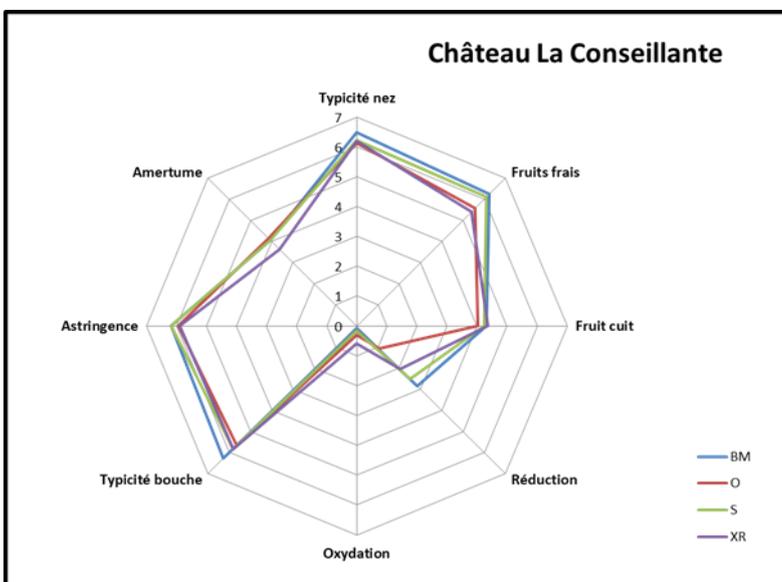
### Château Carbonnieux

Au Château Carbonnieux, la modalité sulfitée étant très réduite, il est difficile de conclure quant à la distinction des échantillons à l'aveugle.

Concernant les profils aromatiques, seuls les critères « typicité visuelle » et « typicité bouche » sont significativement différents, la modalité « sulfitée » étant mieux évaluée pour la typicité visuelle alors que la modalité sans sulfite est mieux notée pour la typicité bouche.



### Château La Conseillante

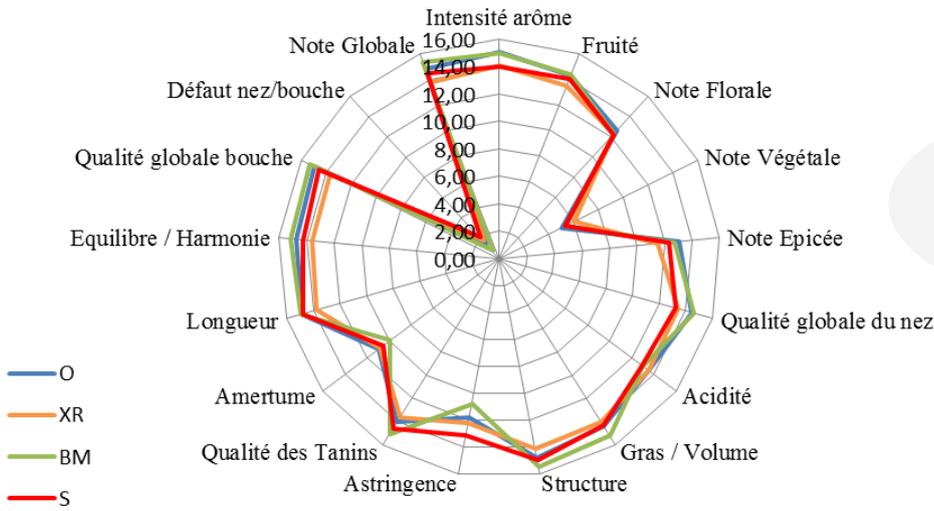


Des différences significatives sont obtenues entre les modalités Bioprotection et sulfitées, mais le nombre de dégustateurs préférant l'une ou l'autre des modalités est identique.

Aucune différence significative n'est mise en évidence pour les critères évalués avec les profils.

Le profil sensoriel (Test Friedman) réalisé au chai du Château La Conseillante montre des différences non significatives entre les modalités.

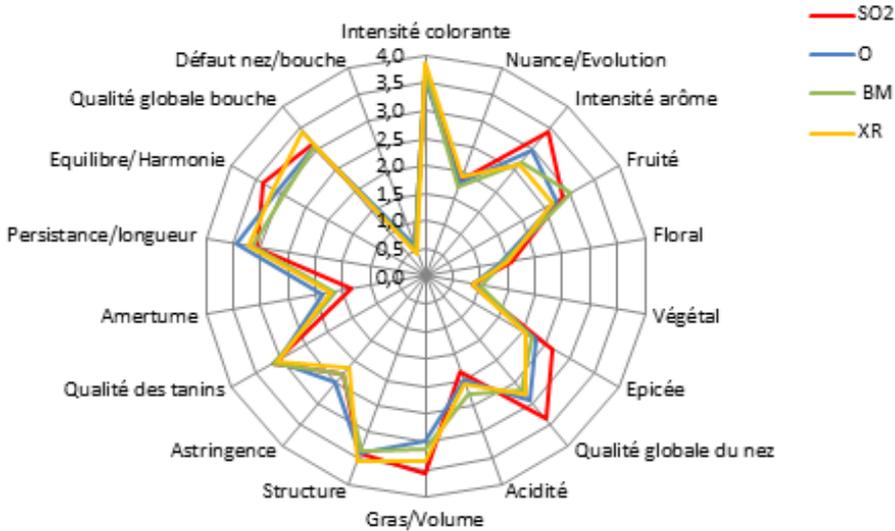
Château La Conseillante



Dégustation réalisée au Château la Conseillante auprès de 19 professionnels.

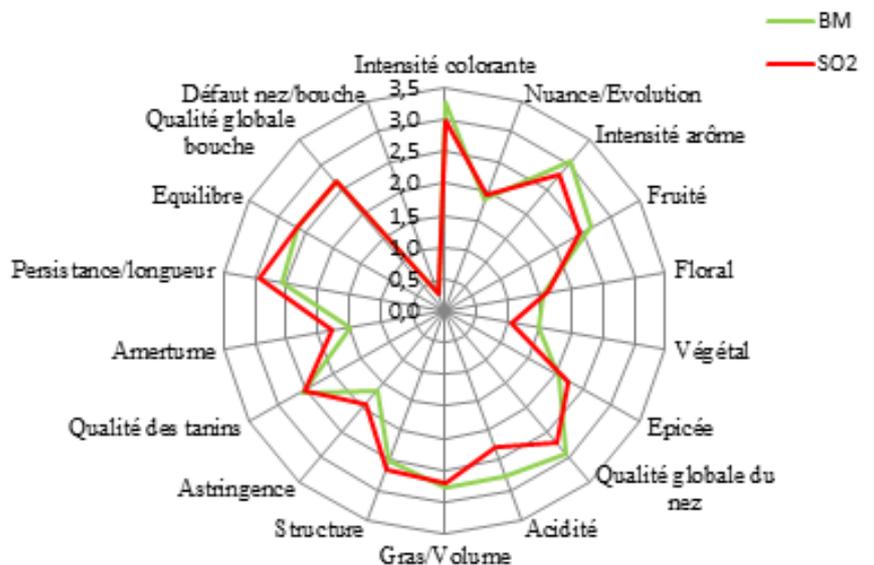
Résultats de la dégustation Commission technique Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine

Château La Conseillante



Pour le Château La Conseillante nous trouvons l'intensité aromatique et la qualité globale du nez plus élevée pour la modalité sulfitée.

Domaine du Bourdieu



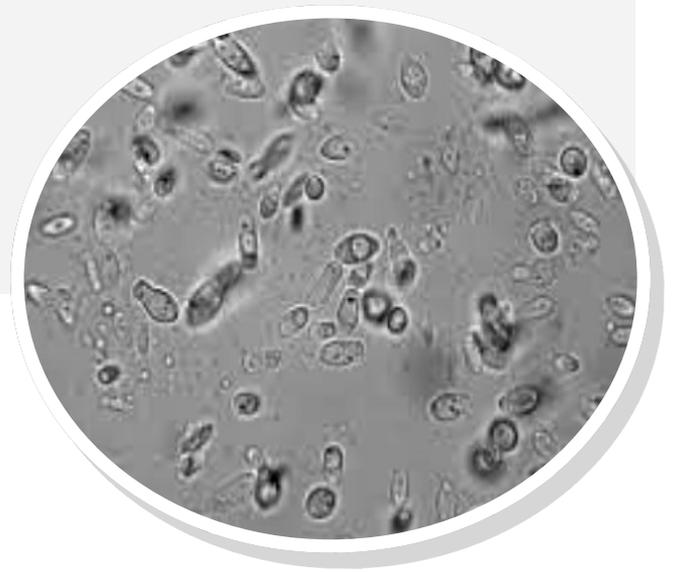
Au Domaine du Bourdieu la modalité Bioprotection présente des résultats plus élevés pour l'intensité colorante, l'intensité aromatique, la qualité globale du nez et l'acidité.

## Test *Brettanomyces*

Au Domaine du Bourdieu la différence entre les deux modalités (sulfité et BioProtection moût) est très faible.

Pour Château La Conseillante la différence est plus marquée, et ce même si les tests d'éthyl-phénols ont confirmé qu'aucune molécule n'avait été produite. Les modalités présentent des populations très élevées sauf la modalité avec levurage précoce avec une population plus faible mais aussi dangereuse.

Il faut tenir compte qu'un développement de *Brettanomyces* ne s'accompagne pas systématiquement d'une production de phénols volatils.



## EXPERIMENTATIONS EN COURS

### PROJET RESPECT - Réduction des sulfites

#### BioProtection Procédés et Caractérisation.

1. Déterminer l'impact d'itinéraires à faible niveau voire zéro sulfites sur la communauté microbienne globale, la composition chimique, colloïdale et sensorielle des moûts et des vins.
2. Développement d'outils microbiologiques à activité bioprotectrice:
  - Utilisation des levures à activités bioprotectrices: alternative à l'effet antiseptique et antioxydant du SO<sub>2</sub> (utilisation sur vendange ou sur jus de raisin).
  - Utilisation des phages (et/ou de leurs lysines) pour le contrôle des bactéries indésirables.
3. Impact des nouveaux procédés sur la stabilité physique chimique des vins pendant l'élevage.
4. Evaluer par la technique de RPE ( Résonance Paramagnétique Electronique), la capacité des moûts et des vins à produire des radicaux libres en réponse à un stress oxydant.

## > Conclusion

On note un très bon comportement de toutes les modalités (notamment la modalité sans aucun ajout), que ce soit d'un point de vue de la cinétique de fermentation, des analyses chimiques, des contrôles d'implantation et de la dégustation.

Néanmoins, concernant les blancs, l'absence de sulfitage se traduit par une perte du potentiel antioxydant et de potentiel aromatique, qui n'est pas compensée par l'utilisation de Bioprotection sous la forme de levures non-Saccharomyces ou Saccharomyces.

A noter que l'ensemble des vinifications ont été réalisées sur de la vendange très saine et dans de très bonnes conditions d'hygiène et de fermentation.

Cela tend à montrer que, dans de bonnes conditions, des vinifications sans SO<sub>2</sub> ne semblent pas poser de problème et que différentes méthodes existent pour y parvenir.

Le projet RESPECT (qui est la suite de ce projet) se proposera de tester des conditions plus difficiles avec de la vendange plus abimée, des préfermentaires à froid plus importantes, Bio protection plus en amont sur vendange... De plus il permettra de poursuivre les recherches jusqu'à la partie élevage et d'évaluer le comportement des différentes modalités jusqu'à la mise en bouteille.

Ce que l'on peut noter:

- L'implantation précoce de Bioprotection (rouge) modifie les équilibres microbiens.
- On note un effet significatif de la Bioprotection sur les niveaux de populations en bactéries acétiques à l'encuvage et début de FA
- Un effet significatif sur les populations non sacharomyces en début de FA en rouge, supérieur à l'effet du SO<sub>2</sub>
- Une bonne occupation de l'espace des différentes Bioprotection en début de FA
- L'effet sur Brettanomyces est, lui, à confirmer même si certains résultats semblent favorables à l'utilisation précoce de LSA et à la Bioprotection
- Une mauvaise implantation de *S. cerevisiae* utilisée au levurage en rouge pour la modalité Bioprotection (compétition avec la LSA de Primaflora VR)
- Pas de grande différence au niveau de la dégustation entre les différentes modalités.



## VIGNERONS BIO NOUVELLE AQUITAINE

Avec le soutien de :



Fonds européen Agricole pour le Développement Rural (FEADER) :  
l'Europe investit dans les zones rurales

Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine

7 Le Grand Barrail - 33570 MONTAGNE

Tél : 05 57 51 36 60 - Fax : 05 57 55 13 53

[conseil@vigneronsbionouvelleaquitaine.fr](mailto:conseil@vigneronsbionouvelleaquitaine.fr) - [www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr](http://www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr)

