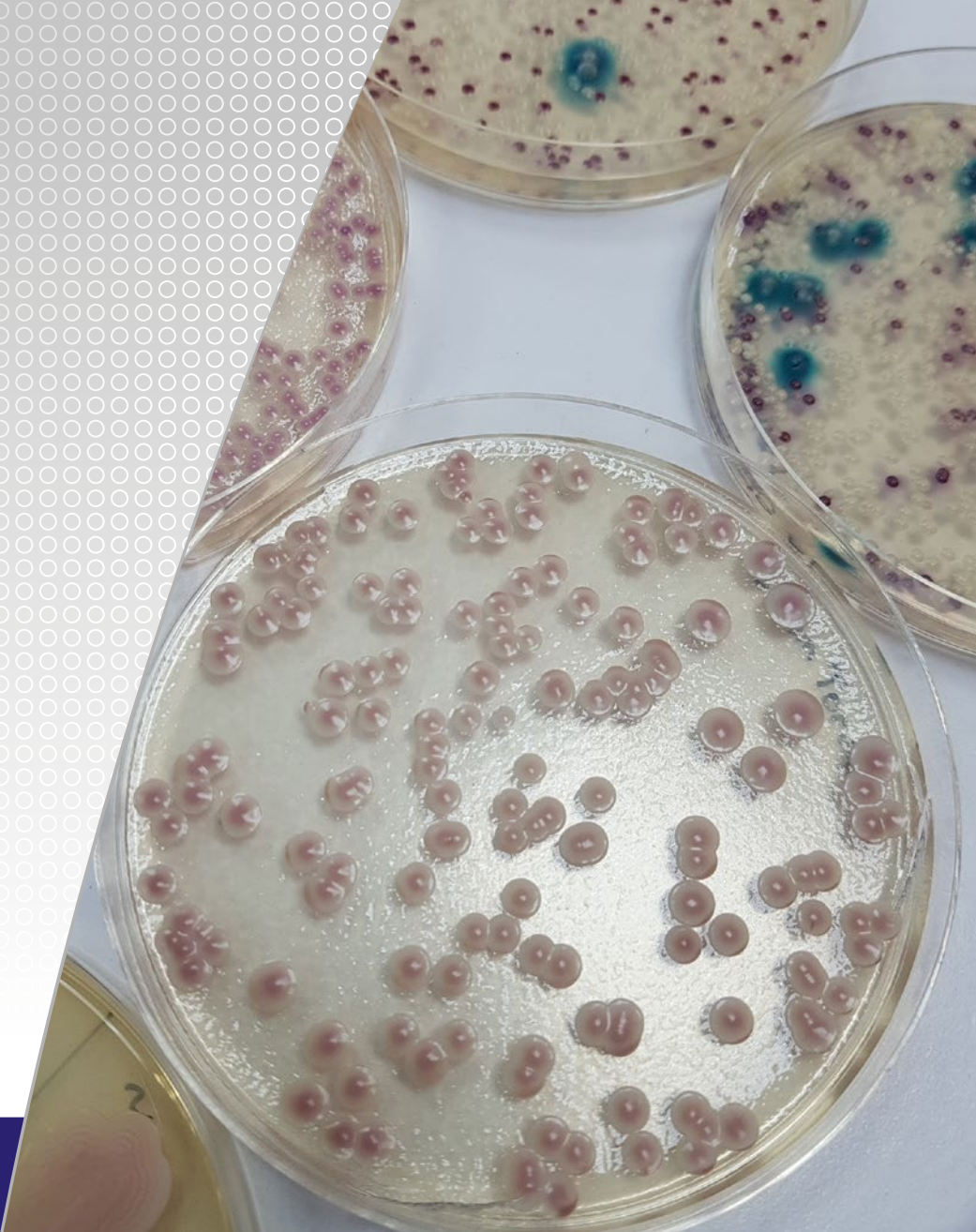


A photograph of several petri dishes containing microbial cultures. The dishes are arranged in a cluster, with one in the foreground showing numerous small, reddish-brown colonies on a white agar surface. Other dishes in the background show similar colonies, some with blue-green patches. The background of the top left of the cover has a white grid of small circles.

INSTITUT FRANÇAIS
DE LA VIGNE ET DU VIN

ITINÉRAIRES
N° 30

Levures et bactéries en œnologie

Valorisation des biodiversités

INTRODUCTION

Depuis les travaux initiés en 1857 par Louis Pasteur sur les fermentations lactiques et alcooliques, la microbiologie et l'œnologie sont deux sciences indissociables pour qui veut comprendre en profondeur le monde des fermentations, les maîtriser et améliorer la qualité des vins.

Les nouvelles techniques d'étude du vivant et notamment les analyses génétiques, ont révélé l'existence d'un monde microbien beaucoup plus complexe que ce que l'on avait coutume d'imaginer.

La vision très "mécaniste" d'une succession linéaire de quelques levures et bactéries s'est transformée en un monde de communautés dynamiques inter-agissantes.

Parallèlement, les nouvelles attentes des consommateurs et de la filière en terme de qualité des vins (qualité aromatique et sanitaire), les changements de pratiques ou de cahiers des charges, la réduction des intrants à la cave comme à la vigne, et les changements climatiques annoncés (augmentation du degré alcoolique et baisse de l'acidité), modifient à la fois notre regard sur ces communautés microbiennes, sur leur impact et sur leur valorisation technique.

Ce Cahier Itinéraires a pour objectif de réactualiser les connaissances sur la biodiversité des levures et bactéries du raisin jusqu'à l'élevage, les différentes techniques de sélection et de caractérisation des microorganismes du vin, sur la maîtrise des fermentations (indigènes ou utilisation de souches commerciales) et des altérations microbiologiques ainsi que sur les bonnes pratiques d'hygiène. Ces nouvelles références ont été acquises à partir des résultats de projets récents (Casdar Levains Bio, WildWine, Feder Hybridation des levures et caractérisation et sélection de bactéries....) mis en œuvre par les partenaires techniques et financiers ayant contribué à l'élaboration de cet ouvrage.



Sommaire



Introduction	2
Sommaire	3
Chapitre 1 : Levures	4
- Biodiversité des levures	
- Maîtrise des fermentations alcooliques	
- Sélection des levures	
- Caractérisation des levures	
- Nouvelle application des levures en œnologie : la bioprotection	
Chapitre 2 : Bactéries	20
- Biodiversité des bactéries	
- Maîtrise des fermentations malolactiques	
- Sélection et caractérisation des bactéries	
Chapitre 3 : Hygiène, nettoyabilité et environnement	27
- Bio-adhésion	
- Nettoyabilité	
- Procédures adaptées et effluents	
Bibliographie	31

Biodiversité des levures

Levures : diversité sur baie

La baie de raisin héberge une communauté microbienne complexe constituée de moisissures, de bactéries et de levures, qui évolue de la nouaison jusqu'au stade de maturité du point de vue des niveaux de population et de la diversité. Ainsi, aux stades les plus précoces, les espèces *Basidiomycètes* sont dominantes, puis on observe l'augmentation du nombre d'espèces *Ascomycètes*, notamment celles qui possèdent des capacités fermentaires (*Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Candida* et *Pichia*). Ce changement peut être lié à la disponibilité et à la composition en nutriments ; au cours du développement du fruit, la quantité d'exsudats augmente ainsi que leurs teneurs en sucres et l'acidité diminue.

D'autres facteurs influencent la densité et la diversité des levures de la baie notamment les conditions climatiques. Lors de millésimes froids et pluvieux, la diversité des espèces est modifiée et le niveau de population augmente. L'impact des traitements phytosanitaires de la vigne sur les populations de levures de la baie a été étudié dans de nombreux travaux qui rapportent des résultats différents selon la région viticole. Il a été observé des niveaux plus importants en termes de diversité et de densité pour la communauté de levures dans les vignobles conduits en mode biologique par rapport au mode conventionnel. En revanche, concernant *Saccharomyces cerevisiae*, des travaux récents (Gironde, Espagne) montrent que la diversité génétique des souches du vignoble est plus élevée

en mode conventionnel qu'en mode biologique. Enfin, l'état sanitaire des baies est sans doute un des facteurs prépondérants. La dégradation de la structure de la pellicule de la baie par l'action de champignons comme le *Botrytis* ou par des phénomènes climatiques comme la grêle, entraîne l'augmentation de *S. cerevisiae* ou l'apparition de certaines espèces associées à des défauts du vin comme *Zygosaccharomyces bailii*.

La baie de raisin est la première source de levures impliquées dans le processus fermentaire. Les travaux d'isolement et d'identification des levures du raisin, menés dans différentes régions viticoles du monde, ont rapporté, à maturité, la présence des genres *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* et *Sporidiobolus*. D'autres espèces non-*Saccharomyces*, comme *Issatchenkia orientalis*, *Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii* et *Hanseniaspora spp* sont également trouvées. Ces levures non-*Saccharomyces* présentes lors des stades préfermentaires peuvent contribuer à l'expression aromatique des vins. Cependant, l'agent principal de la fermentation alcoolique (*Saccharomyces cerevisiae*) est rarement isolé à partir d'échantillons de baies de raisin. L'espèce d'altération *Brettanomyces bruxellensis* est également très peu présente au vignoble, le raisin ne constituant

pas, à ce titre, la première source de contamination des vins par cette levure.

Les levures du raisin sont disséminées dans l'environnement par différents vecteurs, comme le vent, les oiseaux, les insectes et l'homme, expliquant ainsi l'absence de preuve scientifique concernant l'existence de levures dites de terroir ou de Cru, c'est-à-dire de levures associées spécifiquement à un domaine viticole, notamment sur plusieurs années consécutives. La cave est également une source d'inoculum de levures au vignoble en particulier de *S. cerevisiae*. Ainsi, il est possible d'identifier des levures industrielles ou proches génétiquement de Levures Sèches Actives (LSA) dans des vignobles à proximité de caves sur un rayon de 300-400 m. Ce résultat illustre le retour possible de levures de la cave au vignoble, ce dernier se trouvant ainsi enrichi en souches présentant de bonnes capacités de fermentation. Dans le cas de mise en œuvre de pieds de cuve, les parcelles proches de la cave seront de préférence échantillonnées pour augmenter les chances de sélectionner des *S. cerevisiae*. Ainsi, vignoble et cave sont fortement connectés d'un point de vue microbiologique, dans le sens du raisin vers la cave, mais également dans l'autre sens, cave-raisin, sens qui était jusqu'à présent méconnu.

À retenir

- Le climat, le stade de développement de la baie de raisin, le mode de conduite et l'état sanitaire ont un impact sur la biodiversité des levures de la baie de raisin.
- *Saccharomyces cerevisiae* et *Brettanomyces bruxellensis* sont extrêmement rares à la surface de la baie à maturité.
- Raisin et cave sont fortement interconnectés, le raisinensemence le moût, la caveensemence, en retour, le vignoble.

Levures : une diversité sur moût qui évolue avec les opérations de vinification

Les levures retrouvées au cours de la vinification constituent un groupe spécifique plus ou moins homogène dont l'évolution a sans doute accompagné l'expansion de la vinification. Dans le moût en fermentation, on ne retrouve que très rarement des levures issues du raisin.

Parallèlement, le chai se caractérise par une atmosphère chargée en levures tant fermentaires qu'oxydatives. Ces populations peuvent varier quantitativement dans le temps en fonction de l'accroissement de l'activité (cf figure 1).

Au chai, avant vendange, *Saccharomyces cerevisiae* se retrouve éventuellement sur le pressoir et la cuverie, d'autres surfaces peuvent aussi constituer un abri sûr pour ces levures.

Même si parfois *Brettanomyces* et *Saccharomyces* peuvent provenir du raisin, il semble que ces levures soient généralement issues de populations spécifiques de la cave.

Le processus d'élaboration du vin à partir du raisin est caractérisé par une diminution constante de la diversité levurienne. Cette diminution s'explique par l'intolérance de la plupart des levures aux conditions liées à la fermentation alcoolique : sensibilité aux conditions anaérobies, à l'éthanol, au manque d'azote, à la présence de SO_2 ... (cf figure 2).

Le pressurage a pour effet de réduire fortement la proportion d'*Aureobasidium pullulans* et de favoriser l'émergence de *Metschnikowia pulcherrima* et *Hanseniaspora uvarum*, auparavant très minoritaires sur baies. Cette sélection est accentuée par le débouillage qui réduit de 50 % le nombre de genres présents.

Ces différentes espèces de levures, apiculées et/ou oxydatives et ne produisant que très peu d'alcool, se développent alors. L'ajout de SO_2 limite le développement d'*Hanseniaspora* et de *Metschnikowia* et sélectionne *Saccharomyces* tout en induisant une période de latence plus longue. Lors de ces étapes peuvent apparaître aussi des levures des genres *Candida*, *Pichia* ou *Issatchenkia* (cf figure 3).

Après quelques jours, ces espèces sont progressivement supplantées par des levures fermentaires très actives et résistantes à de grandes quantités d'éthanol, il s'agit notamment de *Saccharomyces cerevisiae*, mais aussi parfois *Saccharomyces uvarum*, plus rarement *Torulaspora delbrueckii* ou *Schizosaccharomyces pombe*.

Les espèces oxydatives peuvent réapparaître de manière sporadique à l'occasion de diverses opérations de vinification : aération, chaptalisation, bâtonnage, ... et en fonction de leur résistance à l'éthanol et au SO_2 . En fin de fermentation, les espèces non-*Saccharomyces* résistantes à l'éthanol peuvent se maintenir à des niveaux encore élevés (1000 UFC/mL), c'est notamment le cas de *Brettanomyces bruxellensis*.

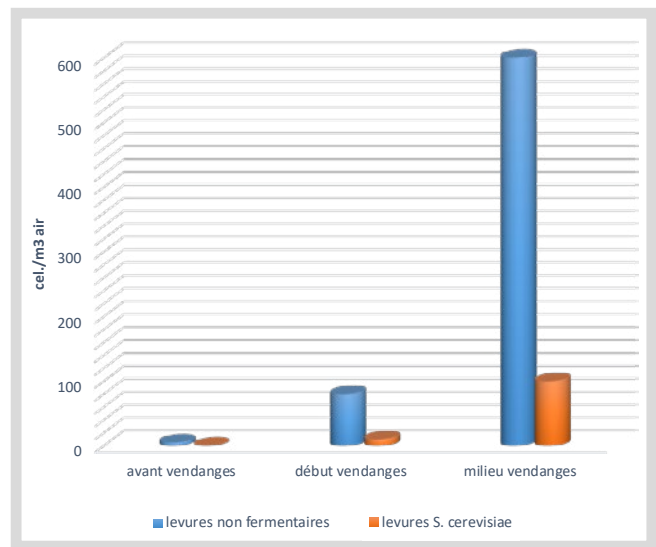


Figure 1 : Évolution de la quantité de levures dans l'atmosphère des chais durant les vendanges. IFV Vertou, 2001.

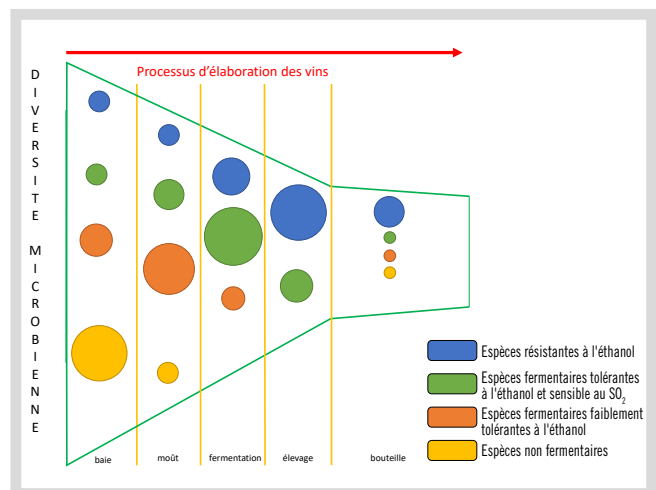


Figure 2 : Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres, relations avec la qualité du vin. D'après V. Renouf, 2006.

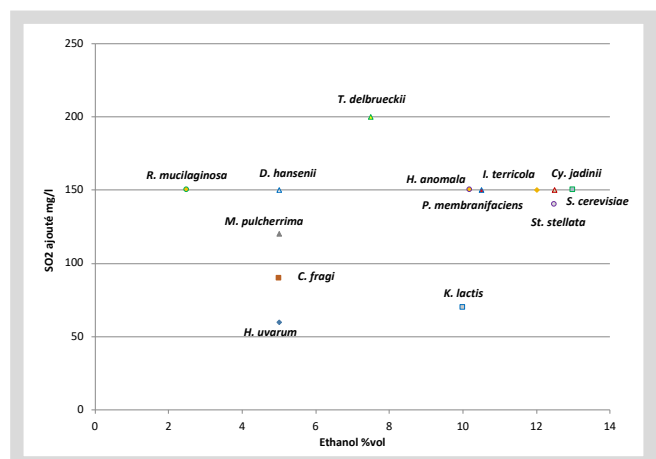


Figure 3 : Résistance à l'ajout d'éthanol ou de SO_2 de différentes espèces de levures retrouvées dans les moûts. Croissance des levures après ensemencement en présence soit de SO_2 , soit d'éthanol. IFV Beaune, 2002.

Fermentation : une grande diversité de souches de *Saccharomyces*

Contrairement à ce que l'on a longtemps pensé, la fermentation alcoolique n'est pas à une simple « course de relais » entre espèces différentes, elle se caractérise aussi par un grand nombre d'individus au sein de chaque espèce. De ce consortium émergent parfois une ou deux souches dominantes, alors que les souches minoritaires sont rarement présentes plus d'un jour ou deux et toujours en faible proportion. Ces souches dominantes peuvent ponctuellement se maintenir plusieurs années, mais il est plus fréquent d'enregistrer un renouvellement annuel.

La mise en œuvre de pieds de cuve permet généralement d'induire une fermentation dynamique ou active tout en conservant une certaine diversité (comme montré sur la figure 4 avec 10 souches de *S. cerevisiae* différentes dans le pied de cuve). Dans de plus rares cas elle se caractérise, comme pour l'ensemencement avec une L.S.A., par la présence exclusive d'une seule souche.

Curieusement, il est fréquent que les souches présentes dans ces cuvées soient différentes de celles amenées par le pied de cuve.

Il n'est pas rare qu'en fin de fermentation alcoolique le nombre de souches différentes augmente, la tolérance à l'éthanol modifiant alors la diversité.

C'est dans ces phases finales de la fermentation alcoolique, de la fermentation malolactique ou en cours d'élevage que peut se développer la levure *Brettanomyces bruxellensis*.

Les études menées en Bourgogne en 2007, par l'IFV ont montré que pour un même vin on pouvait avoir une dizaine de souches différentes de *Brettanomyces bruxellensis* dont les proportions respectives fluctuent au cours de l'élevage (cf figure 5).

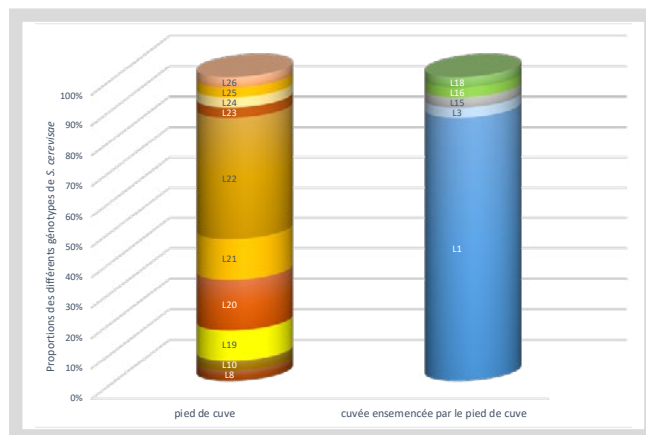


Figure 4 : Diversité de *S. cerevisiae* au cours de pied de cuve indigène et cuvée associée. IFV Vertou, 2013.

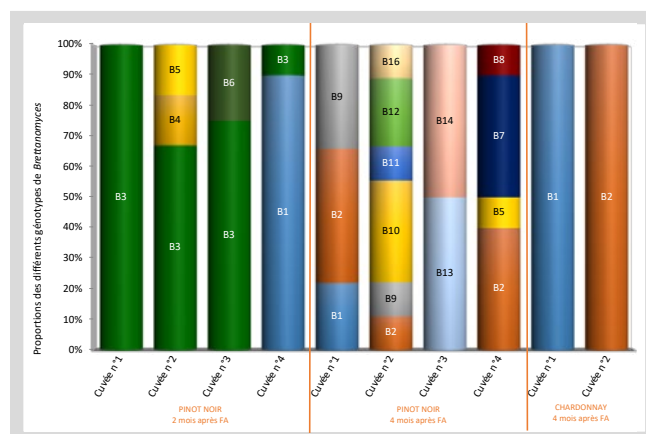


Figure 5 : Évolution des différents génotypes de *Brettanomyces bruxellensis* durant l'élevage. IFV Beaune, 2007.

À retenir

- *Saccharomyces* est une levure de chai. Dans les conditions de la pratique, la recherche d'une « levure de terroir » est illusoire.
- Le pressurage, le débordage, la teneur en éthanol et le SO_2 modifient la diversité levurienne.
- Des espèces presque absentes sur baies sont retrouvées dans les moûts (*Metschnikowia*, *Hanseniaspora*,...).
- L'ajout de SO_2 limite le développement des levures non fermentaires et sélectionne le genre *Saccharomyces*.

Maîtrise des fermentations alcooliques

La fermentation alcoolique est une étape clé dans l'élaboration d'un vin et les levures en sont les actrices principales. La maîtrise de la fermentation est donc essentielle pour assurer la qualité sanitaire, organoleptique et microbiologique du vin fini. Les vinificateurs peuvent jouer sur quatre leviers majeurs pour maîtriser leurs fermentations : les levures, la température de fermentation, la nutrition azotée et la turbidité pour les fermentations en phase liquide.

Nous étudierons ici uniquement l'aspect mis en œuvre de la fermentation, en détaillant les différentes possibilités qui s'offrent au vinificateur :

> **La fermentation en flore indigène** : la transformation des sucres du moût en éthanol et dioxyde de carbone (CO₂) est assurée par des levures indigènes parfois présentes naturellement sur la cuticule des raisins, mais surtout par celles issues de l'environnement du chai. Cette fermentation peut être soit

non-interventionniste (spontanée) en laissant se développer la flore naturelle, soit être orientée en réalisant des pieds de cuve.

- **La fermentation spontanée** : fermentation d'un moût sans inoculation de levains, donc réalisée spontanément par des levures indigènes présentes dans l'environnement de l'exploitation.

- **La fermentation avec des pieds de cuve** : réalisation en amont de la date de vendange d'un levain servant à ensemercer le jour J avec une population massive de levures *Saccharomyces* indigènes afin de garantir les départs en fermentation au moment de l'encuvage.

> **La fermentation avec utilisation de Levures Sèches Actives (LSA)**: le déclenchement de la fermentation alcoolique est assuré par des levures sélectionnées, additionnées en population importante. Cette addition de levures sélectionnées permet un déclenchement et un déroulement maîtrisé de la fermentation.

Les fermentations indigènes

- Fermentations spontanées indigènes

Comme vu précédemment, *Saccharomyces cerevisiae* se rencontre peu sur raisin où elle est concurrencée par les moisissures et des levures non-*Saccharomyces*. Ces souches peuvent être retrouvées dans le moût avec d'autres issues du chai. La plupart d'entre elles ne transforment pas, ou très peu, les sucres du raisin en alcool. Ces souches ont des aptitudes très différentes d'adaptation au moût et aux conditions de fermentation.

Les levures (non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces cerevisiae*) qui se maintiennent dans le moût (à l'entrée en cave) et qui vont se développer (résistantes au SO₂, température, inertage...), peuvent dans certains cas participer à une vinification sans incident lorsqu'elles sont bien adaptées et dans d'autres cas, entraîner des difficultés fermentaires et/ou des déviations organoleptiques (cf tableau 1).

La fermentation spontanée indigène est donc réalisée par un consortium microbien disparate difficilement contrôlable

ACCIDENTS CONSTATÉS	LEVURES IMPLIQUÉES
FERMENTATION INCOMPLÈTE	non- <i>Saccharomyces</i> et certaines <i>Saccharomyces</i>
PRODUCTION IMPORTANTE DE SO ₂	<i>Saccharomyces</i>
GOÛT DE RÉDUIT (H ₂ S, MERCAPTAN)	<i>Saccharomyces</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Hansenula</i>
PRODUCTION IMPORTANTE D'ACÉTATE D'ÉTHYLE, D'ACIDE ACÉTIQUE (ACESCENCE)	<i>Hanseniaspora</i> , <i>Kloeckera</i> , <i>Hansenula</i>
DÉSACIDIFICATION IMPORTANTE	<i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i>
MAUVAIS GOÛTS, ODEUR D'ÉCURIE (PHÉNOLS VOLATILS), ODEURS DE CUIR, DE GOUACHE	<i>Brettanomyces</i>
PRODUCTION IMPORTANTE D'ACÉTALDÉHYDE (ÉTHANAL)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomycodes ludwigii</i>
FORMATION D'ÉCUME	<i>Saccharomyces</i>

Tableau 1 - Défauts liés à certaines levures indigènes - IFV, 2015

sans oublier la présence de bactéries acétiques ou lactiques qui peuvent se développer selon les conditions. L'entrée en cave et le traitement de la vendange entraînent des modifications rapides des conditions de milieu (variation de température, production d'alcool, présence de SO₂ (ou pas), oxygène (ou pas), niveau d'acidité, pH ...). Les temps de latence

pour un départ en fermentation alcoolique pourront, d'une situation à l'autre, durer de 3 à 7 jours, voire plus (notamment dans le cas des fermentations en phase liquide en blanc ou en rosé et en fonction de la température). Ce temps de latence peut parfois permettre à des espèces non désirables de se développer et d'être à l'origine de certaines altérations.

- Pied de cuve de souches indigènes

Pour faciliter le départ en fermentation d'un moût, il est primordial que la population en *Saccharomyces* soit suffisamment élevée (minimum 2 millions de cellules par mL de moût) et dans des conditions favorables de croissance (pas de carence azotée, température > 14°C). L'apport initial de levures peut être réalisé par un pied de cuve de flore indigène.

Contrairement à l'inoculation des Levures Sèches Actives (LSA), l'utilisation de levures indigènes ne permet pas d'obtenir une bonne reproductibilité de la flore levurienne et donc une constance de qualité dans les vins (cf tableau 2). Cependant, la sécurité du déroulement des fermentations indigènes, peut être largement améliorée en optimisant la formation d'une biomasse compétitive grâce à la conjugaison de techniques physico-chimiques assurant sa croissance et son implantation rapide dans le moût.

Les études menées dans le cadre d'un projet CASDAR « LevainsBio » tendent à montrer que la réalisation d'un pied de cuve optimisé permet de : (voir encadré p.9).

- Démarrer les fermentations de façon franche et plus rapide que dans le cas d'un levurage classique avec des LSA (phase de latence de 2 jours généralement) (cf figure 6).

	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
LSA	- Maîtrise quantitative et qualitative - « souche pure garantie » - Mise en œuvre rapide et simple	- Coût
INDIGÈNES SPONTANÉES	- Pas d'achat - Diversité de souches - Souches issues de son vignoble ou chai	- Mise en œuvre complexe - Population microbienne inconnue - Possibilité de levures inutiles ou néfastes - Risque d'arrêt de fermentation - Succès aléatoire
PIED DE CUVE	- Pas d'achat - Diversité de souches - Souches issues de son vignoble ou chai - Démarrage rapide en fermentation	- Mise en œuvre complexe - Population native inconnue - Possibilité de levures inutiles ou néfastes - Succès aléatoire

Tableau 2 - Avantages et inconvénients des différentes pratiques de fermentation - IFV, 2015

- Gérer en amont le développement des flores indigènes potentiellement d'altération : le sulfitage et le maintien de la température autour de 25°C du pied de cuve favorisent le développement de *S. cerevisiae*. Au niveau des pieds de cuve, le SO₂ n'est pas ajouté pour son rôle antioxydant mais uniquement pour son influence sur les bactéries et les levures à caractère oxydatif dominant comme certaines *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Hansenula* ...

Un départ rapide est souhaité pour éviter une éventuelle multiplication de *Brettanomyces*, levures susceptibles de dégrader la qualité des vins au stade post-fermentaire.

Contrairement aux fermentations menées par une LSA, un grand nombre de souches différentes (*Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*) interviennent lors des fermentations indigènes ou avec préparation d'un pied de cuve. Généralement, l'utilisation d'un pied de cuve diminue sensiblement le nombre de non-*Saccharomyces* présentes en milieu et fin de fermentation.

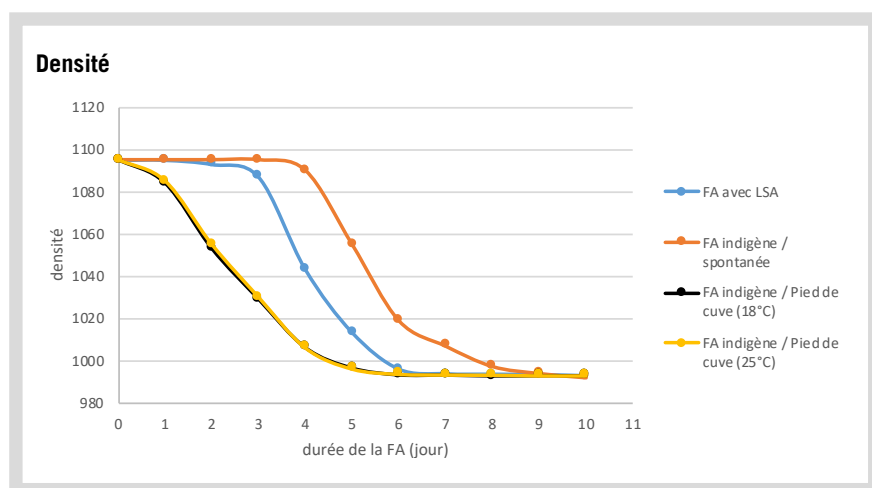


Figure 6 : Suivi de fermentations indigènes (avec ou sans réalisation de pieds de cuve optimisés) ou avec utilisation de LSA - IFV Rodilhan - Levainsbio 2013.

MISE EN OEUVRE DES FERMENTATIONS INDIGÈNES

La maîtrise des fermentations spontanées nécessite la mise en œuvre et la maîtrise totale de moyens appropriés :

- Choisir une vendange de qualité sanitaire indiscutable,
- Maîtriser les triturations de la vendange et les délais avant encuvage,
- Mettre en place une hygiène vinaire poussée mais non abusive, centrée sur les matériels (bennes, pompes, vannes, robinets, pressoirs...),
- Utiliser du matériel spécifique pour éviter les contaminations et autres pollutions. Pompes, tuyaux et drapeaux sont des maillons sensibles à cet égard,
- Retenir de préférence les premiers lots de vendanges récoltés, la pression microbienne étant moins forte dans les locaux et sur le matériel œnologique,
- Adapter le sulfitage (3 à 5 g/hl) pour sélectionner les souches de levures les plus performantes,
- Choisir des températures adaptées au profil produit recherché,
- Vérifier la présence suffisante d'azote assimilable du moût,
- Un suivi par des analyses microbiologiques en laboratoire peut apporter un accompagnement intéressant (présence et dénombrement de levures).

PROTOCOLE DE PIED DE CUVE LEVURIEN OPTIMISÉ

Choix de la vendange

- Choisir une vendange de qualité sanitaire indiscutable,
- Vendanger 6-7 jours avant la date de la vendange, l'équivalent de 1 à 3% du volume de la ou des cuve(s) à ensemer,
- Utiliser si possible une cuve adaptée au volume du pied de cuve et l'inertage du contenant avant le départ de la fermentation est conseillé.

Mise en œuvre et maîtrise du Pied de Cuve

- Pressurage sans débordage, sulfitage du jus à 2-3 g/hL recommandé,
- Nutrition azotée (objectif : 200 mg/L azote assimilable),
- L'objectif est de créer de la biomasse, l'aération en début de fermentation, est plutôt recommandée,
- Maintien de la température autour de 25°C,
- Suivi quotidien par prise de densité/température et dégustation. (L'objectif n'est pas de faire un vin, mais de multiplier la biomasse levurienne pour ensemer la cuvée)
- Analyse de la teneur en acidité volatile avant utilisation.



Utilisation du Pied de Cuve

- Utiliser uniquement un pied de cuve ayant une perte de densité rapide (-10 à -15 points/jour) et sans défaut organoleptique,
- Incorporation entre 1060 et 1020,
- Éviter un écart de température entre le pied de cuve et la cuvée à ensemer (écart maximum de 10°C).

Les Levures Sèches Actives (LSA) : utilisation des levures sélectionnées

Le levurage par LSA vise une meilleure maîtrise de la fermentation alcoolique. Il permet d'introduire en grande quantité une souche sélectionnée pour ses capacités fermentaires. Pour garantir l'implantation des levures et pour limiter la durée de la phase de latence, il est conseillé d'apporter au minimum 2 millions de cellules par mL de moût (équivalent de 10-20g/hL de LSA).

Il est recommandé d'incorporer le levain au moment où la population indigène est la plus faible et dans un milieu où le SO_2 libre n'est pas en excès. La précocité du levurage est donc souhaitable pour coloniser le milieu :

- **Moût blanc ou rosé** : immédiatement après débourbage et mise en température ;
- **Vendange rouge non sulfitée** : au cours du remplissage de la cuve ou après remontage d'homogénéisation ;
- **Vendange rouge sulfitée au-dessus de 3 g/hL** : il est préconisé de décaler le levurage et le sulfitage de quelques heures (2 à 3 heures), d'autant plus que la dose en sulfites est importante.

En cas de non-sulfitage en blanc ou en rouge, il est possible d'envisager une protection microbiologique très en amont, éventuellement dès la récolte (voir la partie Bioprotection p.17).

Il existe une large gamme de souches de levures sélectionnées. Le choix de la levure à utiliser doit être raisonné en fonction (outil IFV sur les fiches levures - cf p.12) :

- du type de levurage : levure starter (mise en fermentation rapide), spécifique, régionale, reprise de fermentation, prise de mousse,

- de son aptitude à révéler des composés aromatiques ou à extraire les polyphénols par exemple,
- de la nature du cépage et du moût (rouge, blanc, rosé),
- du style de vin recherché (vin primeur, de garde...),
- de la température de fermentation souhaitée,
- de la résistance à l'alcool et au sucre,
- de ses besoins en azote assimilable.

La réhydratation des levures sèches actives (LSA) est toujours recommandée même s'il existe des différences notables entre les souches. Le protocole de réhydratation des levures est précisé sur les paquets des LSA mais suit dans les grandes lignes les indications suivantes :

> **Réhydratation** : ajouter 1 kg de LSA à 10 litres d'eau ou d'eau sucrée (à 50 g/L de saccharose) ou de jus de raisin non sulfité dilué à 50 % à 37 - 40°C dans un récipient de 20 litres. Laisser reposer durant 20 minutes puis bien homogénéiser.

> **Levurage** : Incorporer dans 100 hL de jus ou de vendange. Homogénéiser la cuve avec une pompe et des tuyaux nettoyés et désinfectés.

De nombreuses avancées sont également faites dans la production de ces LSA pour faciliter leur utilisation (saupoudrage direct, équipement spécifique d'incorporation des LSA...) et garantir leur implantation dans le moût.



En Nouvelle Aquitaine dans le cadre du projet Européen Wildwine (2012-2014), la réalisation d'un levurage mixte séquentiel (inoculation de levure non-*Saccharomyces* puis de *S.cerevisiae*), a été étudiée en vinification en rouge ainsi que sur les vins liquoreux. Les résultats ont montré que cette pratique a eu notamment un

effet significatif sur la production d'acidité volatile sur vins liquoreux (cf figure 7), teneurs moins élevées sur les vins pour les modalités levains mixtes et un effet sur le profil aromatique et les qualités sensorielles des vins rouges et liquoreux en faveur de l'utilisation de levains mixtes (cf tableau 3).

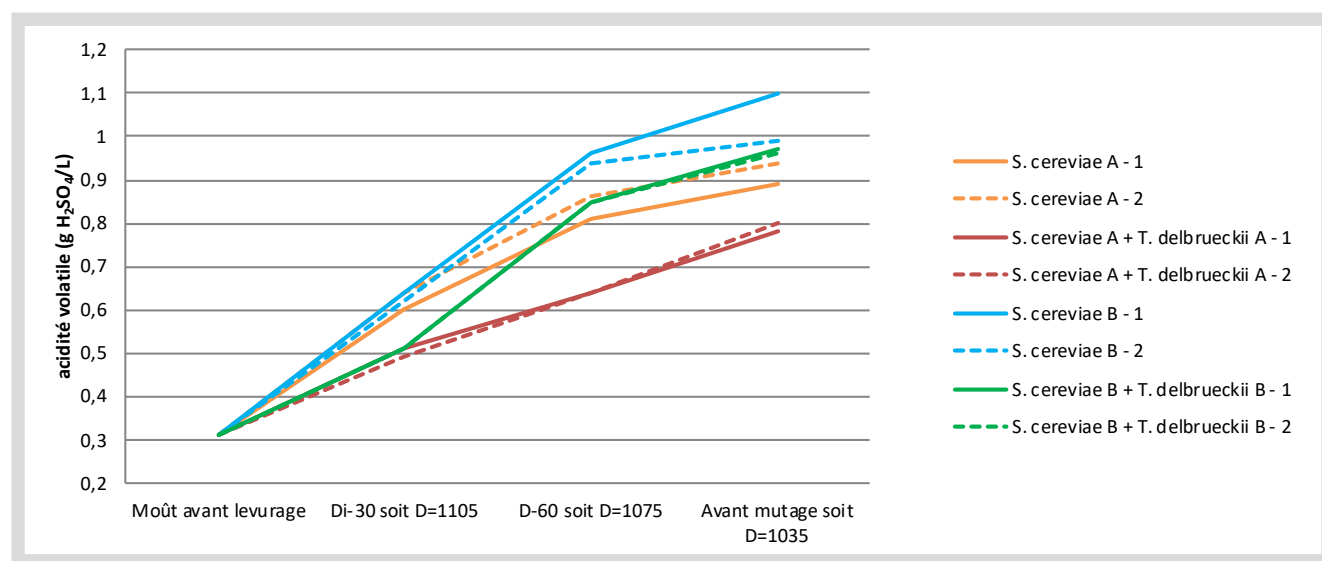


Figure 7 : Evolution de l'acidité volatile au cours de la fermentation alcoolique - Essai sémillon - IFV Blanquefort, ISVV, VBNA, 2014.

Test de Kruskal-Wallis										
	3-mercaptohexan-1-ol	acétate de 3-mercaptohexyle	2-phényléthanol	acétate d'isoamyle	acétate de 2-phényléthyl	décanoate d'éthyle	hexanoate d'éthyle	octanoate d'éthyle	butanoate d'éthyle	
	Pamplemousse	Buis	Jacinthe -rose	Banane	Rose fanée	Poire savon	Pomme verte	Pêche savon	Ananas	
ScA vs ScA + TdA	<	NS	NS	>	NS	NS	NS	NS	NS	
ScA vs ScB+TdB	<	nd	NS	>	>	NS	NS	NS	<	
ScA+TdA vs ScB	>	NS	>	<	>	NS	NS	NS	NS	
ScA+TdA vs ScB+TdB	<	nd	>	<	>	NS	<	NS	<	
ScB vs ScB+TdB	<	nd	NS	>	NS	<	NS	NS	NS	

Tableau 3 - Profil aromatique des vins après fermentation alcoolique - Essai Sémillon - IFV Blanquefort, ISVV, VBNA, 2014.

* Sc : *Saccharomyces cerevisiae*

* Td : *Torulaspora delbrueckii*

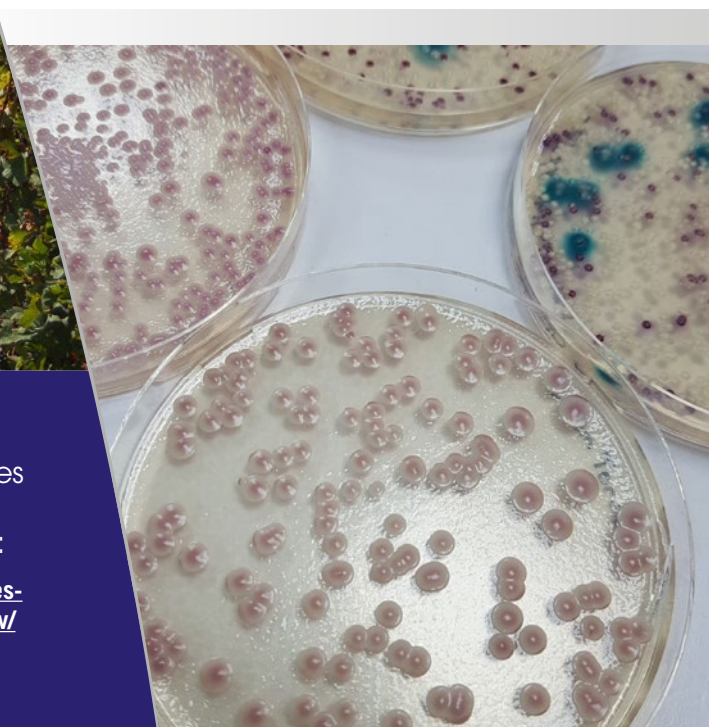
Sélection des levures

L'histoire de l'étude des levures œnologiques débute en 1866, quand Louis Pasteur démontre que la fermentation alcoolique n'a pas de cause chimique mais est liée à l'action de levures naturellement présentes sur les raisins.

Les premières levures sélectionnées sont mises sur le marché dès les années 1920 sous forme de levain liquide puis sous forme de Levures Sèches Actives (LSA) dans les années 1960. Ces premières souches de *Saccharomyces* proposées proviennent de sélection massale ; c'est-à-dire isolées de leur milieu naturel. L'évolution des techniques a permis dès 1990 de sélectionner des souches en laboratoire par hybridation (ou breeding). A ce jour, environ 350 préparations commerciales de levures sont disponibles en France. L'IFV a contribué ces 30 dernières années à sélectionner une vingtaine de souches (sélection massale et hybridation). Initialement, l'ensemencement en levures sélectionnées visait uniquement à assurer des

fermentations alcooliques « sécurisées » puis les levures ont été utilisées pour des applications plus variées, en fonction de propriétés de plus en plus ciblées et précises. Cet élargissement considérable de gamme s'est réalisé grâce à de meilleures connaissances sur les levures (propriétés, besoins, résistances,...) et pour répondre à de nouvelles exigences de qualités de produits (non-production de phénols volatils et de SO₂, synthèses d'arômes spécifiques...).

Depuis 2005, le travail de sélection des levures s'est élargi aux souches non-*Saccharomyces*, naturellement présentes dans la fermentation ; surtout dans les phases préfermentaires. De nouvelles souches de levure non-*Saccharomyces* sont sélectionnées chaque année (une vingtaine actuellement, seules ou en mélange) avec des applications diverses (rôle fermentaire, qualitatif ou de bioprotection).



Liste des levures sélectionnées
par l'IFV, disponible sur le site
internet www.vignevin.com :

<https://www.vignevin.com/outils/fiches-levures/levures-selectionnees-par-lifv/>

Biodiversité levurienne : réservoir naturel pour la sélection de souches d'intérêt

La sélection de souches de levures (*Saccharomyces* ou non-*Saccharomyces*) débute dans une grande majorité des cas par le prélèvement de moûts ou de vins en fermentation spontanée ; on parle alors de sélection massale (cf figure n°8 ci-dessous).

Comme décrit précédemment, les espèces levuriennes évoluent en fonction des étapes préfermentaires et de l'avancement de la fermentation.

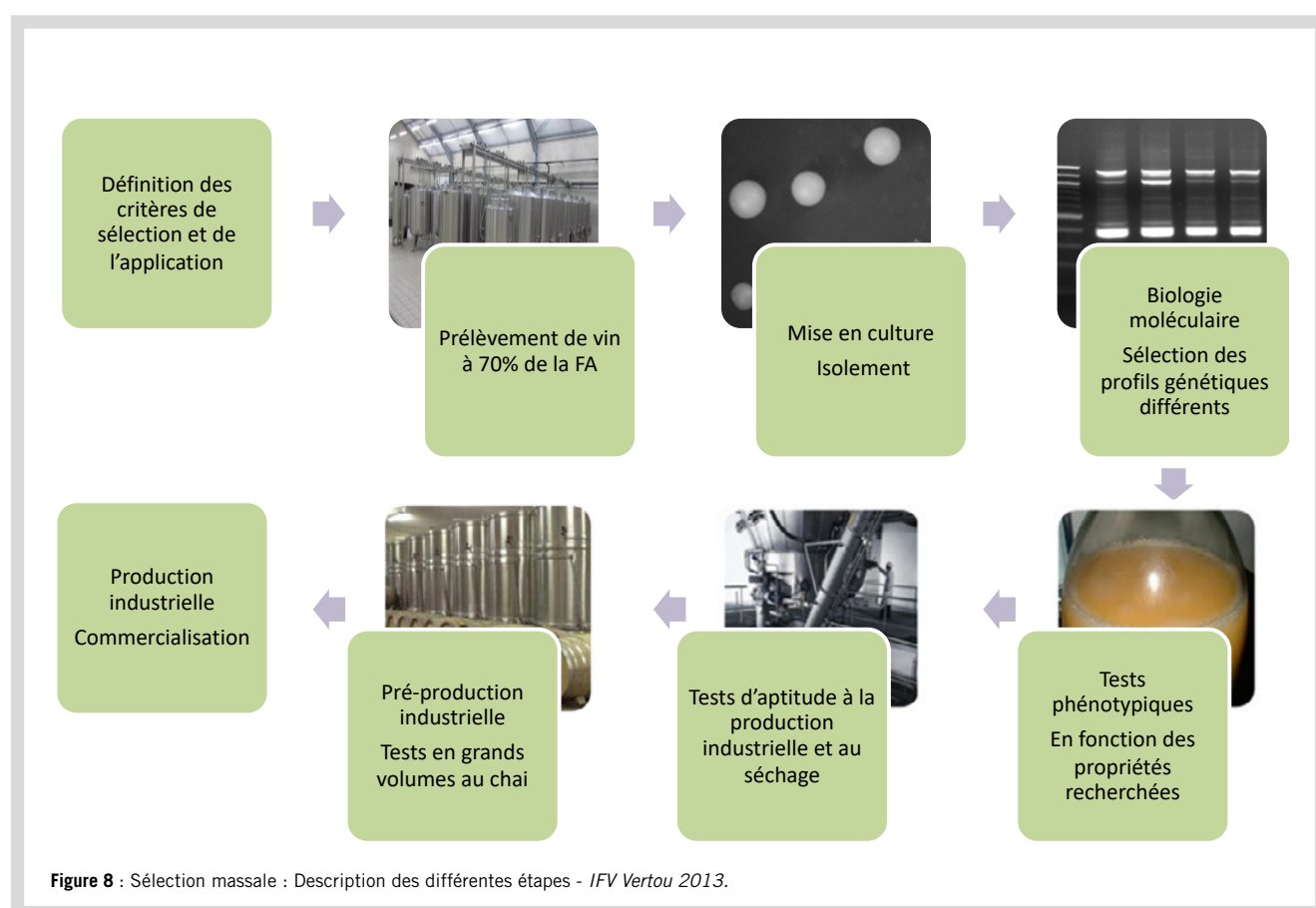
Des prélèvements sur moût ou au cours des premiers jours de fermentation sont privilégiés pour la sélection de levures non-*Saccharomyces* ; alors que pour la sélection de *Saccharomyces*, les prélèvements sont réalisés dans la seconde partie de la fermentation alcoolique spontanée. Ces prélèvements permettent la constitution d'un soucier, opération préalable à la sélection de souches de levures d'intérêt œnologique.

Le profil génétique est établi pour chaque colonie afin d'identifier le genre et l'espèce des souches ainsi que la diversité intraspécifique des souches présentes dans ces prélèvements.

Les colonies issues de ces prélèvements sont isolées et mises en collection (conservation à -80°C). Les souches ayant des profils génétiques différents sont ensuite caractérisées en laboratoire : tests phénotypiques (caractère Killer, production d'H₂S...), évaluation des capacités fermentaires des souches sélectionnées et comparaison de leur bilan physico-chimique sur milieu synthétique et moût naturel. Les souches les plus performantes sont caractérisées plus finement en fonction de l'objectif de la sélection (caractère Phénol off flavor, besoin en azote, résistance aux hauts degrés alcooliques, production de composés aromatiques spécifiques...).

Les souches sélectionnées (*saccharomyces* et non-*saccharomyces*) sont par la suite évaluées en cuverie expérimentale et sur le terrain avant commercialisation.

La caractérisation des levures non-*Saccharomyces* est sensiblement différente de celle des levures *Saccharomyces*. Ces levures non-*Saccharomyces* sont peu ou pas fermentaires et doivent, de ce fait, toujours être utilisées avec une *Saccharomyces* qui assure la totalité ou la fin de la fermentation alcoolique. La caractérisation de leur aptitude fermentaire consiste donc à évaluer la quantité d'alcool qu'elles sont capables de produire.



L'hybridation pour améliorer les souches naturelles

La technique d'hybridation, ou breeding, consiste à croiser deux souches de levure pour regrouper au sein d'une même cellule les propriétés technologiques d'intérêt des deux souches parentales ; ce qui permet d'une part d'optimiser la performance des souches obtenues sans affecter pour autant leur nature biologique et d'autre part d'exploiter et d'accroître la biodiversité des levures.

Cette technique de sélection permet de répondre aux exigences des opérateurs pour des levures plus performantes qui combinent des propriétés spécifiques (par exemple : tolérance supérieure à l'éthanol, meilleure utilisation du sucre et assimilation de l'azote, qualités organoleptiques accrues...).

L'hybridation repose sur la propriété des levures *Saccharomyces* (et certaines non –*Saccharomyces*) de se multiplier par voie sexuée (sporulation) en conditions de stress dans leur environnement naturel. Au laboratoire, il est possible de mimer cet état de stress (limitation des sources carbonées et azotées) et de faire sporuler plusieurs souches et d'isoler leur descendance : cette technique de sélection est donc naturelle et loin des techniques d'obtention d'OGM. Après digestion de la paroi de l'asque, les spores sont séparées sur milieu solide à l'aide d'un microscope muni d'une micro-aiguille (micromanipulateur) qui permet de les isoler (cf Figure 9).

Les souches hybrides sont ensuite caractérisées en laboratoire et en cuverie expérimentale de la même manière que les souches issues de prélèvements de vins en fermentation spontanée (sélection massale, vu précédemment).

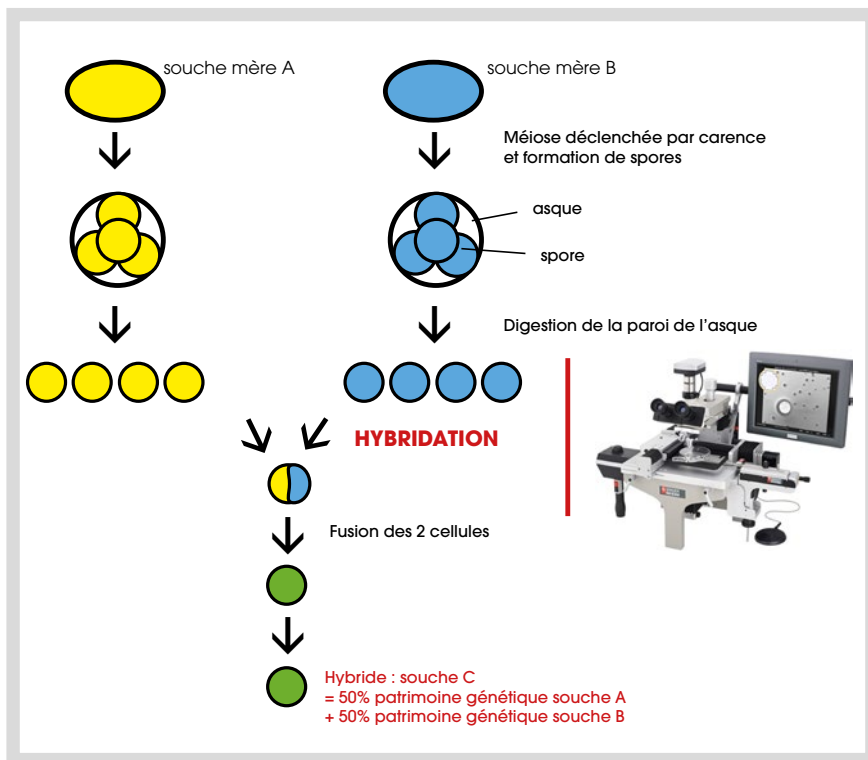
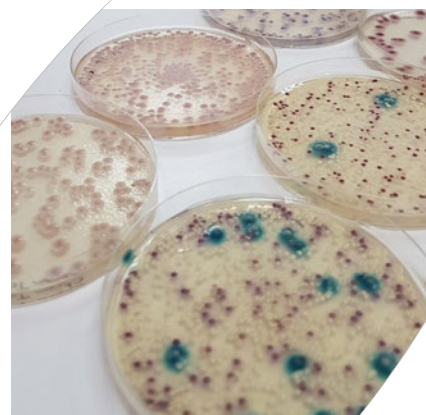


Figure 9 : Croisement de 2 souches de levure pour l'obtention d'une souche hybride - IFV Vertou, 2013.



Caractérisation des levures

Caractériser les levures pour aider les vignerons à choisir les souches les mieux adaptées à leurs vins.

Grâce aux sélections massales et par hybridation, les vignerons ont le choix parmi une vaste gamme de levures œnologiques. Parmi ces nombreuses souches de levures, aux propriétés souvent très différentes, dont dépend de façon non négligeable la composition et la qualité du produit fini, il est parfois bien difficile de faire son choix.

En parallèle des sélections de levures, l'IFV caractérise les différentes souches de levures commerciales et rend accessible à tous les vinificateurs des informations précises, les plus complètes et les plus objectives possibles via des Fiches levures diffusées sur le site internet de l'IFV www.vignevin.com.

Depuis l'apparition des premières levures œnologiques, l'IFV teste en laboratoire la quasi-totalité des levures dès l'année qui suit leur mise sur le marché français, sur milieux synthétiques, en conditions parfaitement contrôlées et identiques pour toutes.

Les levures *Saccharomyces* sont caractérisées afin d'évaluer leur aptitude fermentaire et leur conditions optimales d'utilisation. Bien que les non-*Saccharomyces* ne soient pas amenées à assurer la fermentation jusqu'à son terme, certains des critères à définir constituent un minimum requis pour l'élaboration d'un vin et sont, pour la plupart, communs à ceux recherchés sur les *Saccharomyces*.

Les principaux critères de caractérisation des levures sont les suivants :

- **Identification botanique : Genre, espèce, (variété)**

- **Phénotype Killer** : Certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de produire une toxine entraînant la mort des souches y étant sensibles. Trois phénotypes sont définis :

- * Killer (K) : la souche produit la toxine et y est résistante. L'implantation de la souche peut être facilitée si la flore sauvage comporte des souches de phénotype Sensible.

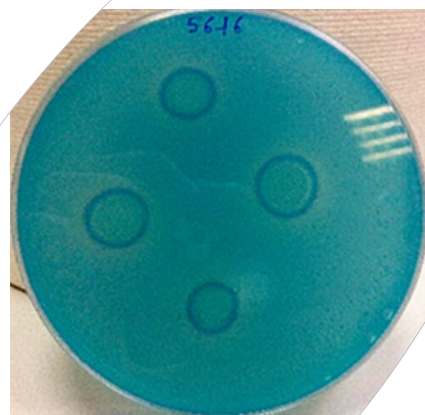
- * Neutre (N) : la souche ne produit pas la toxine et y est résistante. L'implantation de la souche n'est donc pas gênée par la présence de levures Killer dans la flore indigène.

- * Sensible (S) : la souche ne produit pas la toxine mais y est sensible. La souche risque d'avoir une implantation difficile si la flore indigène contient des levures Killer.

Le facteur Killer revêt un caractère particulier en œnologie car il intervient dans la concurrence entre les levures lors de la fermentation alcoolique.

- **Production d'écume** : critère assez peu déterminant pour le choix d'une levure de vinification, cependant, excessive, elle risque d'occasionner des débordements de cuves (perte de produit, surcroît de travail et problèmes d'hygiène en cave)

- **Déroulement de la fermentation alcoolique et production de certains composés (critère primordial dans la réussite de la vinification)** : en fonction des différents milieux utilisés pour ces tests (synthétiques ou moûts), on peut mesurer différents paramètres, en particulier le temps de latence (plus il est court, moins il y a de risque d'altération du moût ou du raisin) ainsi que la vitesse de fermentation. En fin de fermentation, les dosages de l'éthanol acquis, acidité volatile, SO₂ total, sucres résiduels, glycérol, acétaldéhyde (principal combinant du SO₂), molécules aromatiques et les mesures du rendement sucre/éthanol et du pourcentage d'acide malique dégradé, sont déterminants dans le choix de la souche, en fonction du produit final souhaité. Il est également intéressant de mesurer le pouvoir alcoogène des levures de fermentation (niveau maximal d'éthanol atteint, seuil supérieur de résistance de la souche à ce composé) car les degrés potentiels des raisins et moûts mis en fermentation de nos jours sont souvent élevés et risquent, à cause du dérèglement climatique et de certaines pratiques à la vigne, de l'être de plus en plus.



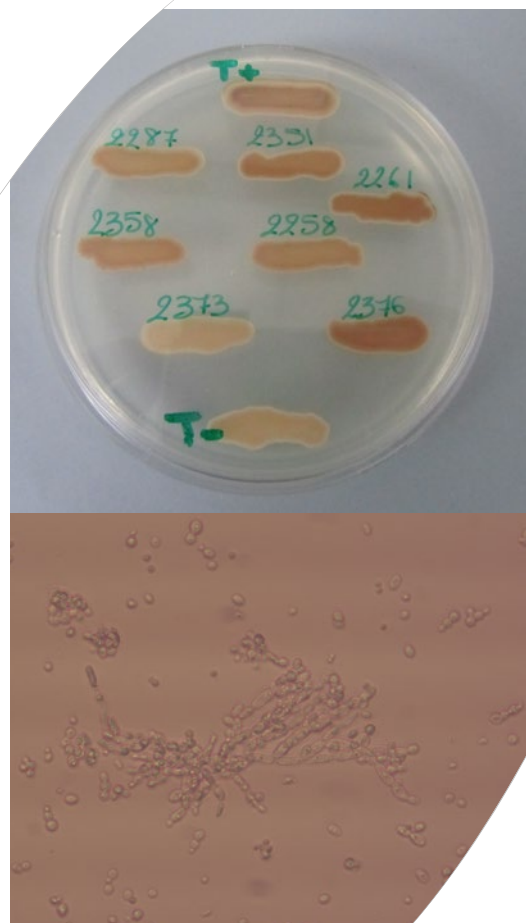
- **Tolérance au SO_2** : elle est très variable entre souches de *Saccharomyces* et globalement faible à très faible pour les non-*Saccharomyces*. Elle est importante à connaître pour optimiser les chances d'implantation des souches (en ajustant les sulfites) et de limiter le temps de latence.

- **Capacité de production de H_2S** : le sulfure d'hydrogène est une cause importante d'odeurs indésirables dites réductives (rappelant l'œuf pourri ou l'eau croupie), plus ou moins exprimées en fonction des conditions de fermentation (teneur en azote assimilable) mais dont le facteur principal est la génétique de la levure.

- **Détermination des besoins en azote et comportement des souches en présence d'une carence en azote** : il est important de connaître ces besoins pour corriger une éventuelle carence qui peut provoquer l'apparition de goût de réduction (production accrue de H_2S), une synthèse plus importante d'alcools supérieurs (arômes « lourds ») et dans les cas extrêmes, un fort ralentissement ou même un arrêt de la fermentation alcoolique. Pour les non-*Saccharomyces*, bien qu'elles n'assurent pas la fermentation alcoolique, il est également important de connaître ce paramètre car si les souches sont fortement consommatrices, l'azote assimilable disponible pour *Saccharomyces* pourrait être insuffisant pour qu'elle termine la fermentation alcoolique.

- **Gamme de température optimale de fermentation** : certaines souches sont très sensibles à des températures trop basses ou trop élevées et cela peut être déterminant dans la réussite d'une fermentation alcoolique.

Les fiches levures reprennent également les informations fournies par le levurier (date et lieu de sélection, caractéristiques de la souche, spécificités intéressantes pour un profil produit recherché, ...).



Une meilleure connaissance de la génétique des levures pour mieux évaluer les levures œnologiques

Il est bien sûr possible depuis de nombreuses années de caractériser taxonomiquement les levures (PCR ITS, PCR NTSU,...), voire de descendre au niveau infraspécifique ou clonal (PCR interdelta pour *Saccharomyces cerevisiae* ou RAPD L15 et A2 ou microsatellites pour les non-*Saccharomyces*).

Depuis quelques temps les études s'attachent à mettre en évidence l'existence de certains métabolismes à l'aide de tests génétiques simples. Ainsi, les principaux thiols variétaux retrouvés dans les vins que sont le 3MH, l'A-3MH et la 4MMP ont des précurseurs principalement liés à un acide aminé : la cystéine. Certaines levures ont la possibilité de libérer ces composés en les séparant de l'acide aminé. Cette potentielle libération semble liée à plusieurs gènes. L'un d'entre eux, le gène IRC7, a été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il est présent en plusieurs copies et peut être présent sous une forme complète fonctionnelle (IRC7 LT) ou sous une forme ayant subi une délétion de quelques bases ADN et

donc non-fonctionnelle (IRC7). Les deux formes peuvent se retrouver chez la même souche, nous avons ainsi trois éventualités : 1/présence exclusive de la forme non-fonctionnelle, 2/ présence exclusive de la forme fonctionnelle et 3/ mélange des deux formes.

Il est possible d'amplifier ce gène par PCR et de déterminer ainsi le « statut IRC7 » de la souche étudiée. Pour une recherche d'expression des thiols variétaux, ce sont principalement les souches possédant la forme fonctionnelle du gène qui seront privilégiées, sans que ce test ne soit une garantie absolue d'aptitude des souches à cette révélation aromatique.

D'autres métabolismes pourraient être approchés par la génétique (besoins en azote, production de SO_2 ou résistance au SO_2 ,...), mais l'absence de marqueurs ou gènes candidats robustes contrarie encore pour l'instant la mise au point de tests de routine.

Nouvelle application des levures en œnologie : la bioprotection

Qu'appelle-t-on « bioprotection » en œnologie ?

La bioprotection consiste à utiliser des cultures microbiennes naturelles issues de matières premières végétales ou d'aliments afin d'éviter leurs altérations et d'accroître leur qualité et/ou sécurité. Cette pratique utilisée depuis de nombreuses années en industrie agro-alimentaire se développe depuis peu dans la filière vinicole. Il n'existe aucune définition officielle de la bioprotection en œnologie.

Elle est présentée comme une alternative microbiologique au rôle antiseptique du SO_2 . Elle consiste à implanter sur raisin, sur moût (ou sur vin) des micro-organismes connus et maîtrisés pour qu'ils colonisent le milieu au détriment de la flore indigène potentiellement d'altération.

La bioprotection en vinification en blanc et rosé

En vinification en blanc et rosé, il est recommandé d'utiliser des levures non-*Saccharomyces* peu ou pas fermentaires soit directement sur vendange soit en sortie de pressoir.

Les levures *Saccharomyces* peuvent être uniquement envisagées dans les process de vinification sans débourbage.

L'implantation des souches et la colonisation des milieux sont très variables en fonction des espèces levuriennes utilisées et de la dose employée, le niveau de population indigène de la vendange ou du moût et l'état sanitaire de la vendange.

Ces levures de bioprotection doivent se multiplier sans déclencher la fermentation alcoolique (pour ne pas entraver l'étape de débourbage). L'implantation et la multiplication de ces souches sont souvent limitées par les conditions du milieu (température basse favorable au débourbage ou collage).

L'implantation est variable selon les cas, à titre d'exemple :

- **En Languedoc Roussillon**, l'implantation et la colonisation du milieu ont été très significatives dans l'ensemble des essais (notamment avec *Metschnikowia Pulcherrima* ou *Fructicola, Pichia kluyveri*).

Il est préférable de distinguer le cas des vinifications en phase liquide d'un côté, et des vinifications solides de l'autre. En effet il n'est pas souhaitable d'introduire des souches fermentaires avant le débourbage des moûts blancs ou rosés – le risque d'un début prématuré de fermentation apparaît comme trop important. En vinification en rouge, ne nécessitant pas de clarification préfermentaire, un départ en fermentation n'est pas préjudiciable, sauf dans le cas de macération préfermentaire à froid.

La protection étant uniquement microbiologique, il est nécessaire de prévoir des alternatives pour l'absence de sulfites à ce stade avec notamment une protection efficace contre l'oxygène et ou l'utilisation de plus de froid.

- **En Val de Loire**, les résultats sont plus mitigés : les souches s'implantent dans la majorité des cas très bien (> 80%) mais l'étape de débourbage est souvent favorable au développement d'*Hanseniaspora uvarum*. Post débourbage, les levures de bioprotection représentent alors 10% à 50% de la population totale. La colonisation des levures de bioprotection dépend majoritairement du niveau des populations de levures indigènes (principalement *Hanseniaspora uvarum*) et des doses des levures de bioprotection.

La réhydratation de ces levures non-*Saccharomyces* est nécessaire. Des évolutions sont envisagées dans la mise en œuvre de ces levures pour faciliter leur application (ex. saupoudrage direct sur les bennes à vendanges).

Pour leur développement, elles utilisent une petite part des ressources en azote assimilable, il est conseillé d'en tenir compte sur la gestion future de la fermentation alcoolique, pour éviter une carence trop sévère en azote.

Ces souches n'étant pas fermentaires, un levurage avec LSA est indispensable pour déclencher la fermentation alcoolique.

À retenir

- Les doses d'emploi et le protocole de réhydratation des non-*Saccharomyces* sont fonction du genre levurien. Le respect des recommandations notées sur l'emballage est indispensable à une réhydratation et implantation correcte de ces souches.
- Incorporer le levain le plus tôt possible dès la récolte si possible ou au quai de réception
- Levurage avec une souche fermentaire après débourbage comme pour une vinification traditionnelle
- Gestion de l'azote

La bioprotection en vinification en rouge

Sur vendanges rouges, la bioprotection peut être assurée par des levures plus ou moins fermentaires, *Saccharomyces cerevisiae* ou non-*Saccharomyces*. L'objectif est de coloniser très vite le milieu, en lieu et place des flores indigènes éventuellement indésirables. Avec l'utilisation d'une souche non fermentaire ou peu fermentaire dans le cas de la macération préfermentaire à froid, un second levurage avec *Saccharomyces cerevisiae* sera nécessaire pour assurer une fermentation complète.

Comme en vinification en phase liquide (blanc ou rosé), les levures utilisées en bioprotection consomment une part plus ou moins importante d'azote du moût. Un apport d'azote est nécessaire lors du levurage avec *Saccharomyces cerevisiae* pour la bonne réalisation de la fermentation alcoolique.

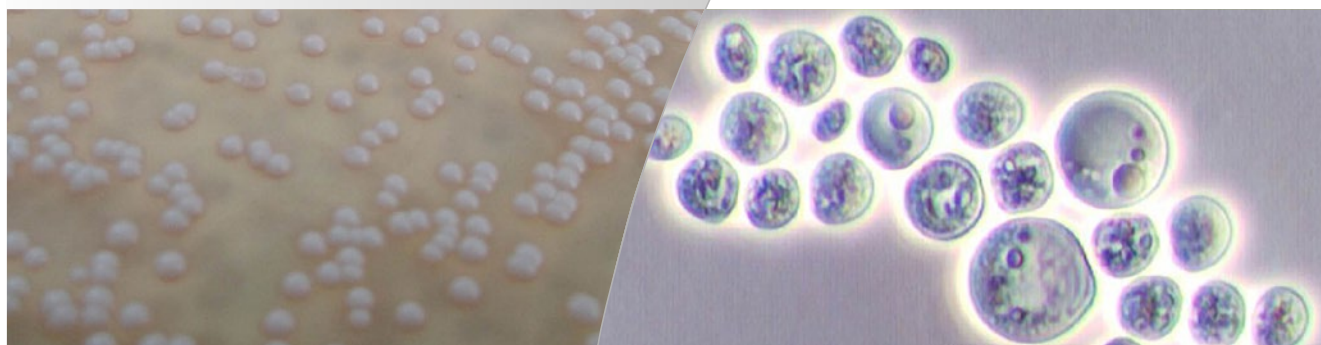
Pour l'usage de levures *Saccharomyces* en bioprotection, sauf s'il est souhaité la coexistence de deux souches dans une même cuvée, il pourra être préférable de choisir de réaliser cette bioprotection avec la souche qui est choisie pour réaliser la fermentation alcoolique – la bioprotection est ainsi comparable à un levurage très précoce.

En cas de re-levurage avec une *Saccharomyces* différente des phénomènes de compétition peuvent apparaître, l'implantation est peu probable et peut entraîner un ralentissement de la fermentation.

Les résultats d'essais montrent un départ plus précoce de la fermentation dans le cas de la modalité avec bioprotection *Saccharomyces cerevisiae* et un départ moins rapide pour la bioprotection par mélange 50% *Saccharomyces cerevisiae*, 50% *Metchnikowia pulcherrima* (cf figure n°10). La souche de *Saccharomyces* utilisée pour le déclenchement de la fermentation alcoolique est différente de celle contenue dans le mélange de souches de la bioprotection. L'impact est visible sur le contrôle d'implantation.

Dans l'association de souches non-*Saccharomyces* fermentaires (en bioprotection) / *Saccharomyces* fermentaire (en FA), un gain organoleptique peut être espéré, il faudra alors rechercher une combinaison de souches compatibles (cas de combinaisons *Torulaspora Delbrueckii* / *Saccharomyces* chez plusieurs fournisseurs). Cela nécessite en général un ensemencement fractionné en permettant à la levure non-*Saccharomyces* de réaliser un début de fermentation.

Comme en vinification phase liquide en blanc et rosé, la protection est microbiologique uniquement et il est nécessaire de prévoir des alternatives pour l'absence de sulfites à ce stade avec notamment une protection efficace contre l'oxygène. Dans ce cas, une vigilance accrue sera nécessaire quant au développement des bactéries lactiques.



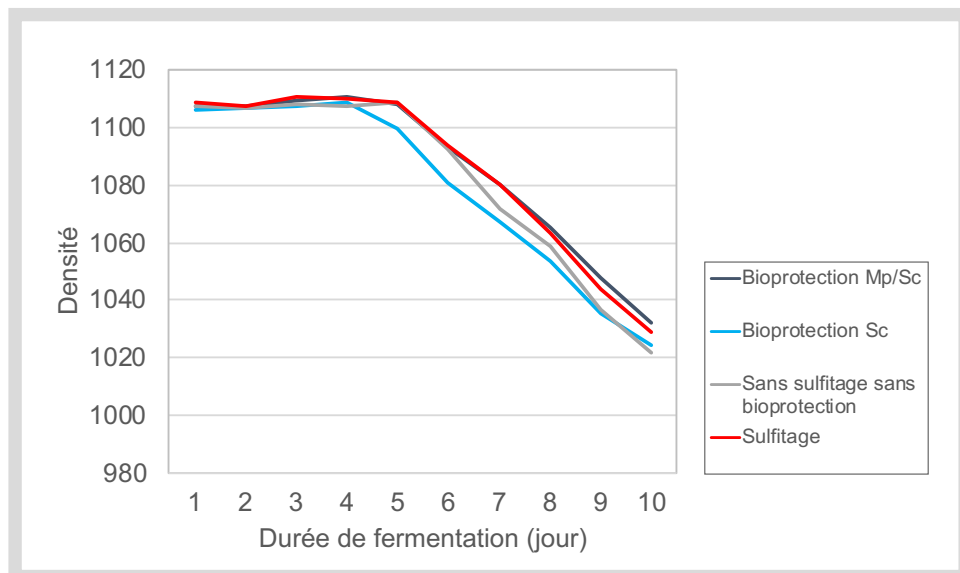


Figure 10 : Suivi de la fermentation suite à différents traitements de la vendange - VBNA/ISW Projet Bioprotection 2016.



À retenir

- Les doses d'emploi et le protocole de réhydratation des non-*Saccharomyces* sont fonction du genre levurien. Le respect des recommandations notées sur l'emballage est indispensable à une réhydratation et implantation correcte de ces souches.
- Incorporer le levain le plus tôt possible dès la récolte si possible ou au quai de réception,
- Sans réhydratation l'utilisation dès la récolte sur la machine à vendanger devient particulièrement facile à réaliser,
- Levurage avec une souche fermentaire en fin d'encuvage ou fin de macération préfermentaire à froid si la souche de bio protection n'est pas ou peu fermentaire (non *Saccharomyces*),
- Si la protection est assurée par une *Saccharomyces*, le relevage n'est pas systématique.

Biodiversité des bactéries

Les bactéries lactiques et bactéries acétiques.

Le moût et le vin contiennent deux types de bactéries très différentes : les bactéries lactiques (BL) et les bactéries acétiques. Les BL sont des bactéries fermentaires. Elles se développent sans respirer, sans besoin d'oxygène. Elles sont utiles pour réaliser la fermentation malolactique (FML) du vin, mais aussi pour produire de très nombreux aliments fermentés comme les yaourts, fromages, choucroute, certaines charcuteries, etc. Néanmoins, toutes les BL ne sont pas capables de coloniser tous les produits. Le groupe des BL contient plusieurs centaines d'espèces qui sont chacune plus ou moins bien adaptées à un ou plusieurs produits. Celle qui se développe le mieux dans le vin est indiscutablement l'espèce *Oenococcus oeni* (*O. oeni*). Elle représente généralement plus de 99% des BL présentes lors de la FML. Les autres espèces, comme *Lactobacillus plantarum* ou *Pediococcus parvulus*, sont très minoritaires et ne contribuent pas à la FML dans la grande majorité des vins. Néanmoins, les lactobacilles et pediococques peuvent parfois être abondants, voire majoritaires, lorsque la FML se prolonge sur plusieurs mois, ou bien dans les vins de pH élevé, proche de 4. où ils se développent plus facilement et parfois plus vite qu'*O. oeni*. La présence de *Pediococcus* est aussi assez fréquente dans les vins blancs, malgré un pH plus bas, notamment en Bourgogne.

Contrairement aux BL, les bactéries acétiques ont un métabolisme respiratoire, ce qui signifie qu'elles ont absolument besoin d'oxygène pour survivre et se développer. Ces bactéries sont toujours nuisibles sur le raisin ou dans le vin, car elles produisent vite et beaucoup d'acide acétique en consommant les sucres ou l'éthanol. Ce sont typiquement les bactéries de la « mère » de vinaigre. Elles s'agglutinent à la surface du vin pour rester au contact de l'air. Ce sont aussi les bactéries les plus faciles à maîtriser, puisqu'il suffit de les priver d'oxygène pour qu'elles meurent.

Nul besoin de sulfites, l'inertage et un bon ouillage de la cuve suffisent à les éliminer. A l'inverse, toute oxygénation importante, par exemple à l'occasion d'un décuvage ou d'un soutirage, leur donne la possibilité de se multiplier et de produire de l'acidité volatile.

Les « bonnes » et « mauvaises » bactéries lactiques : une question de souches, pas d'espèces.

O. oeni est souvent décrite comme la « bonne » bactérie du vin, alors que les autres espèces de BL, comme les Lactobacilles ou les Pediococques, sont plutôt considérées comme des bactéries d'altération. Ces considérations sont fausses. Il est vrai qu'*O. oeni* réalise la FML, ce qui est souhaitable, alors que les autres BL sont plutôt rencontrées dans des vins en cours d'élevage lorsque des altérations sont détectées. Pourtant, ces altérations ne sont pas dues à des « mauvaises » bactéries, mais à une mauvaise maîtrise des microorganismes au cours de l'élevage. *O. oeni* se développe plus vite que les autres BL dans le vin, ce qui explique qu'elle soit plus abondante au moment de réaliser la FML, mais des lactobacilles ou pédiococques peuvent aussi réaliser la FML sans produire d'altération. D'ailleurs plusieurs souches de ces espèces sont aujourd'hui commercialisées pour réaliser la FML. Parallèlement, *O. oeni* peut, elle aussi, produire des altérations si elle reste abondante pendant l'élevage. Ce qui est important, c'est d'éliminer les BL dès qu'elles ont achevé la FML, pour éviter qu'elles ne conduisent à des altérations par la suite, notamment s'il reste un peu de sucres résiduels et quand le pH est élevé (supérieur à 3.5). Aussi il est conseillé de suivre les populations, dans le temps.

O. oeni est une espèce hétérofermentaire, ce qui signifie qu'elle produit de l'acide acétique en consommant les sucres. Si elle se développe trop tôt avant la fin de la fermentation alcoolique (FA),



la conséquence peut être une augmentation de l'acidité volatile. Au contraire, *Lactobacillus plantarum* est une espèce avec laquelle ce risque n'existe pas car elle est homofermentaire, c'est-à-dire qu'elle ne produit pas ou presque pas d'acidité volatile à partir des sucres.

Enfin, il est important de considérer que chaque espèce bactérienne est constituée d'un très grand nombre de souches, qui ont toutes des propriétés différentes. Certaines souches d'*O. oeni* sont incapables de réaliser la FML, d'autres ne sont même pas capables de survivre dans le vin, mais surtout, certaines souches produisent des amines biogènes, confèrent le « goût de souris », consomment l'acide tartrique (maladie de la tourne), ou causent d'autres altérations, pas seulement pendant l'élevage, mais dès qu'elles sont abondantes, comme au cours de la FML. Et il en va de même pour les autres espèces de BL. Ce n'est pas la totalité d'une espèce qui est « bonne » ou « mauvaise », mais bien certaines souches.

L'origine des souches de la FML : la vendange et le chai

Les BL sont disséminées dans tout l'environnement naturel, y compris à la surface des baies de raisin. Leur population totale peut être très limitée, seulement quelques bactéries par baie, ou très importante, jusqu'à plusieurs centaines de milliers par baie, selon la qualité sanitaire du raisin, les conditions du millésime, les traitements appliqués, etc. Ce sont toujours plusieurs dizaines d'espèces différentes de BL qui se présentent dans le vignoble. *O. oeni* en fait partie. Mais à l'image de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cette bactérie qui est si dominante dans le vin est très minoritaire sur le raisin et souvent à peine détectable. Pourtant,

les souches d'*O. oeni* du vignoble peuvent se développer dans le vin et conduire la FML. Au moment de l'encuvage, la plupart des autres espèces de BL ne survivent pas à l'acidité du moût. Lors de la FA, les quelques espèces subsistantes sont exposées à l'éthanol, qui les élimine presque toutes, ou bien ralentit fortement leur capacité à se développer. Seules des souches d'*O. oeni* tolèrent bien ces conditions et se multiplient, généralement en fin de FA, jusqu'à atteindre une population de plusieurs millions de bactéries par millilitre, ce qui suffit pour dégrader l'acide malique en quelques jours ou semaines.

Les souches d'*O. oeni* qui réalisent la FML proviennent généralement du chai. Au cours d'une campagne de vinification, un ensemsencement peut avoir lieu d'une cuve à une autre via l'utilisation des matériels du chai ou simplement en passant par l'air ambiant. Ces bactéries peuvent aussi persister dans le chai d'un millésime à un autre et contribuer à la FML pendant plusieurs années.

Finalement il est possible que la FML soit réalisée par les souches du vignoble, celles du chai, ou un mélange des deux. Il est rare de ne détecter qu'une seule souche pendant la FML. Elles sont souvent plusieurs, jusqu'à plus de 10. Il est difficile de parler de souches dominantes, car la proportion de chaque souche peut complètement changer entre le début et la fin de la FML. Certaines mineures au début, peuvent devenir majoritaires à la fin, alors que des souches abondantes au début peuvent totalement disparaître, et d'autres rester à un niveau stable. Les raisons de cette dynamique sont encore inconnues.



Biodiversité des souches d'*O. oeni* :

L'analyse de vins en cours de FML montre qu'il existe une très grande diversité de souches d'*O. oeni* dans chaque région vitivinicole. Au moins plusieurs centaines ou milliers de souches par région. Les études montrent qu'aucune souche n'est beaucoup plus abondante que les autres. Même les souches industrielles, quand elles sont détectées, le sont à un niveau faible, ce qui suggère que leur utilisation n'est pas préjudiciable pour la biodiversité naturelle. Il n'est pas possible d'affirmer que ces souches sont spécifiques des régions, car les mêmes souches sont parfois détectées dans des régions très éloignées de France ou même à l'étranger. Il est probable qu'elles soient disséminées à travers le monde par les insectes, les oiseaux ou l'activité humaine.

L'analyse génétique des souches confirme bien qu'elles ne sont pas spécifiques de régions. En effet, il est maintenant possible de générer des arbres « généalogiques » des souches, démontrant que les souches d'une région n'appartiennent pas à un seul groupe « régional », mais au contraire à de multiples groupes qui sont également détectés dans d'autres régions.

Néanmoins, les souches d'*O. oeni* sont spécifiques des produits dans lesquels elles se développent. En effet, les souches retrouvées dans le vin, le cidre ou le kombucha (un thé fermenté faiblement alcoolisé) appartiennent à des groupes génétiques différents. Une souche issue de cidre ou de kombucha serait incapable de réaliser la FML dans la plupart des vins car elle n'y survivrait pas. De plus, certaines souches sont spécifiques de certains types de vins. Par exemples, il existe des souches

de deux groupes génétiques différents qui sont adaptées, soit aux vins blancs acides, soit aux vins rouges. Cette adaptation à différents produits est due à l'évolution des bactéries. Les souches de différents groupes génétiques ont acquis différentes capacités à résister à l'éthanol, au pH acide, aux polyphénols, ou à d'autres paramètres du vin. Il est aujourd'hui évident que les souches d'*O. oeni* ont été domestiquées par l'activité humaine. En produisant différents types de vins, nous avons produits différents types d'environnement dans lesquels des souches se sont adaptées pour survivre mieux que les autres.

Peut-on parler de souches de terroir ?

De souches de cru ?

Il est difficile de répondre positivement à ces questions dans la mesure où les souches présentes dans une région peuvent également être retrouvées dans d'autres régions. Il en va, bien sûr, de même pour les souches présentes dans un chai, qui peuvent être détectées dans les vins de chais voisins. De plus, les souches d'une région ne sont pas génétiquement adaptées à une région et elles peuvent changer d'un millésime à un autre. Néanmoins, il est vrai que les souches présentes dans un chai peuvent s'y établir pendant plusieurs millésimes consécutifs. Même si elles ne sont pas génétiquement adaptées au chai ou au vin produit dans celui-ci, elles pourraient apporter une signature particulière à ce vin. A noter que cette signature sera la même dans les vins des autres chais où elle sera présente.

Maîtrise des fermentations

La maîtrise de la FML, lorsqu'elle est recherchée, est importante pour la qualité du vin. Comme pour la fermentation alcoolique, différentes possibilités s'offrent au vinificateur pour déclencher la fermentation malolactique :

> La fermentation en flore indigène : la fermentation est assurée par des bactéries indigènes présentes naturellement dans le vin. Cette fermentation peut être soit non-interventionniste (spontanée) en laissant se développer la flore naturelle, soit être orientée en réalisant des pieds de cuve ou en utilisant des lies de fermentations malolactiques indigènes.

> La fermentation avec utilisation de bactéries commerciales : le déclenchement de la fermentation alcoolique est assuré par des bactéries sélectionnées, additionnées en population importante.

L'utilisation de biomasses bactériennes permet d'éviter ou de minimiser deux risques œnologiques majeurs : la production de phénols volatils par *Brettanomyces*, notamment pour les

vins rouges, et l'évolution oxydative, notamment pour les vins blancs (cf schéma 11).

Pour les vins primeurs, assurer une commercialisation en temps est primordial. Mais, la maîtrise de la FML n'est pas toujours synonyme de rapidité de réalisation. Au contraire, pour certains vins rouges, une FML lente permet une évolution positive des composés phénoliques.

L'ensemencement en co-inoculation ou pendant la fermentation alcoolique tend à se développer mais doit aussi intégrer la situation œnologique. En vinification en blanc, il est souhaitable d'attendre la moitié de la fermentation alcoolique pour inoculer les bactéries. Il est ainsi possible de profiter du métabolisme levurien qui induit une combinaison du SO₂ et une remontée du pH liée à la production d'éthanol. Pour les vins rouges et les vins primeurs en particulier, l'ensemencement bactérien peut être pratiqué en cours de fermentation alcoolique ou même en co-inoculation avec les levures. La dose de bactéries peut alors être modulée pour éviter une FML trop active.

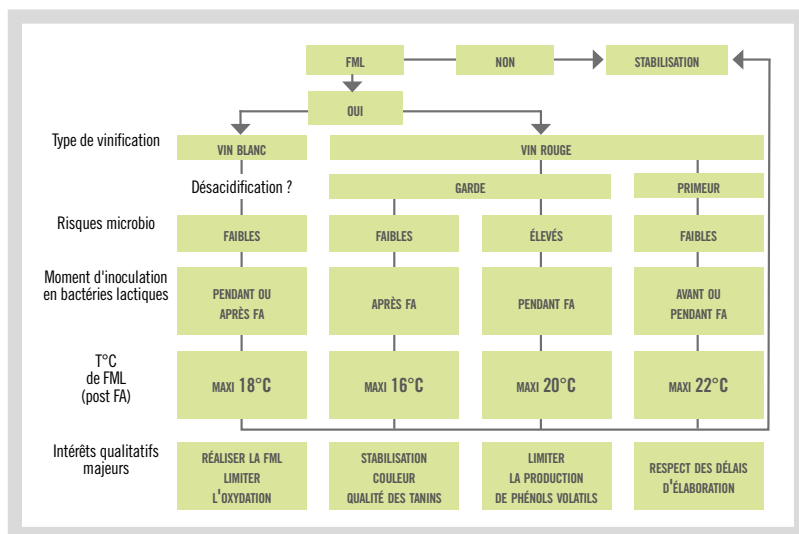
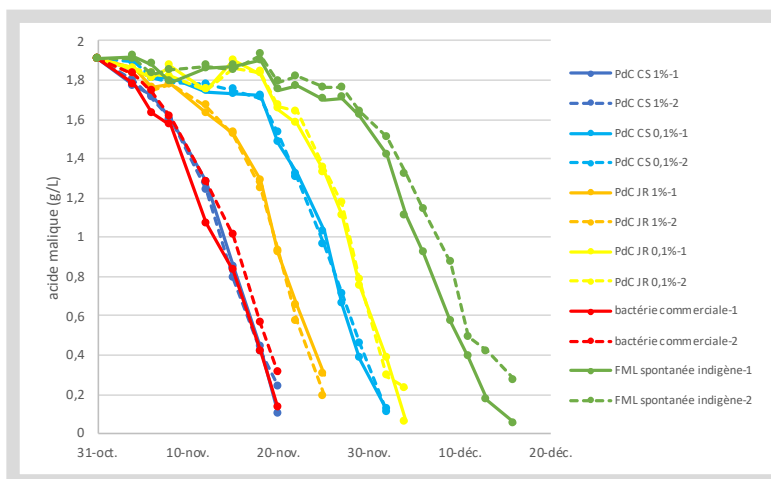


Figure 11 : conduite de la FML et maîtrise des risques microbiologiques selon le profil de vin recherché - IFV 2011

Figure 12 : Cinétique de dégradation de l'acide malique - essai Cabernet Sauvignon - IFV, ISVV, VBNA, projet Oenobio 2019



Maîtrise des fermentations malolactiques indigènes

Aujourd'hui encore, la fermentation malolactique (FML) est beaucoup plus souvent subie qu'elle n'est maîtrisée. En général, elle est réalisée par les bactéries indigènes avec un minimum d'intervention humaine. Elle peut s'achever en quelques semaines, voire quelques jours dans les meilleures situations, mais elle peut aussi être languissante et se prolonger pendant plusieurs mois et parfois même ne jamais s'enclencher. Ce caractère imprévisible peut être la cause d'importantes difficultés pratiques et économiques, d'autant plus que le vin n'est pas protégé jusqu'à l'achèvement de la FML, et qu'il peut être facilement contaminé par des levures *Brettanomyces* et par une évolution oxydative négative. Pourtant, le besoin de maîtriser cette fermentation est de plus en plus perceptible pour éviter les altérations microbiologiques mais aussi pour répondre aux critères des appellations. On observe aussi une évolution des pratiques des vignerons, notamment par le recours à l'utilisation de la co-inoculation. Toutes ces raisons imposent l'utilisation des bactéries commerciales. Cependant, les bactéries du commerce sont une solution coûteuse et qui ne satisfait pas les vignerons souhaitant mettre en œuvre les microorganismes indigènes notamment en vinification biologique.

Une solution pour palier à cette problématique est la réalisation d'un pied de cuve à partir de lies de bactéries indigènes afin de maîtriser la fermentation malolactique tout en utilisant la flore indigène et non des levains commerciaux.

Des travaux sont actuellement menés sur la maîtrise de la FML en flore indigène, par l'utilisation de pieds de cuve réalisés à partir de lies de l'année n-1 conservées à 4°C pendant une année. Ces pieds de cuve complétés en lies n-1 sont réalisés à partir de deux matrices différentes : moût de Cabernet Sauvignon (CS) et Jus de Raisin pasteurisé (JR). Ils sont ensuite ensemencés à 0.1% ou 1% en Cabernet Sauvignon fin FA. Comme on peut le voir sur la figure n°12 en page suivante (chaque modalité est réalisée en duplicata), l'utilisation d'un pied de cuve à partir de Cabernet Sauvignon ensemencé à 1% permet une dégradation de l'acide malique aussi rapide qu'avec l'utilisation d'une bactérie commerciale. Des résultats similaires ont été obtenus sur le cépage Merlot.

Les premiers résultats des essais en cours sont encourageants et doivent donner lieu très prochainement à des préconisations et notamment à un protocole d'ensemencement optimisé.



À retenir

- Les bactéries sont généralement commercialisées pour un volume donné. Selon les caractéristiques du moût ou vin (pH, degré d'alcool...), les bactéries pourront soit être inoculées directement, soit être acclimatées au préalable.
- La température du vin lors de l'inoculation est primordiale à l'implantation des bactéries
- La réalisation de la fermentation malolactique est dépendante des paramètres physico-chimiques du vin (essentiellement pH, SO_2 et degré alcoolique)

Maîtrise des fermentations malolactiques déclenchées par des bactéries sélectionnées

Incidence des facteurs physico-chimiques.

Le principal inhibiteur des bactéries lactiques est certainement le SO_2 . Le niveau de sulfitage appliqué au moût avant fermentation a une influence sur la réalisation ultérieure de la FML. Un sulfitage réalisé après la FA, induisant la présence de quelques mg/L de SO_2 libre indétectable à l'analyse, peut interdire l'activité bactérienne.

Contrairement aux levures, les bactéries lactiques sont plus fortement inhibées par le pH que par le degré alcoolique. Il devient compliqué de réaliser la FML lorsque le pH est en dessous de 3.2, même si certaines souches peuvent réaliser la FML à pH 2.9. En revanche, il est possible de réaliser la FML lorsque le degré alcoolique est supérieur à 15% v/v. Concrètement les effets du SO_2 , du pH et du degré alcoolique se cumulent.

La flore bactérienne responsable de la FML n'a besoin que de très peu de nutriments en termes quantitatifs. Du point de vue qualitatif, la question reste posée, même si un apport de nutriments spécifiques n'a pas souvent d'incidence sur la réalisation de la FML.

FML, acides organiques et gaz dissout.

Le rendement de conversion de la FML tend à augmenter avec la teneur en acide malique. Mais, une teneur faible, inférieure à 1g/l, n'interdit pas pour autant la réalisation de la FML. A l'inverse, l'acide lactique est un inhibiteur de l'activité bactérienne. Aussi, il peut être difficile de reprendre une FML partiellement réalisée avec une teneur en acide lactique supérieure à 1.0 g/l d'acide lactique, voire impossible pour des teneurs supérieures à 2.0 g/L.

Les teneurs en oxygène et gaz carbonique dissous ont une incidence limitée sur la réalisation de la FML.

Impact aromatique

Le métabolisme des bactéries lactiques dépasse largement la simple réalisation de la FML et impacte l'équilibre aromatique des vins. Le métabolisme de l'acide citrique, présent en faible quantité dans les vins, conduit à la formation d'acide lactique, d'acide acétique mais aussi de diacétyle, composé aromatique rappelant le beurre dont l'excès constitue un défaut, mais qui peut aussi contribuer à la complexité du vin. D'une manière plus générale, les bactéries lactiques possèdent des activités enzymatiques pouvant agir sur les caractéristiques aromatiques, qui sont plus ou moins développées selon les souches.

Incidence de la température sur la FML.

Une température fraîche ($<15^\circ$) au moment de l'ensemencement bactérien favorise l'implantation des cellules bactériennes et ce d'autant plus que les conditions sont difficiles (par exemple un pH bas). Une température de seulement 20°C peut alors être létale pour la biomasse inoculée. Mais, une température trop fraîche est aussi pénalisante pour l'activité malolactique. Une température de $15/16^\circ\text{C}$ constitue un compromis intéressant pour avoir une bonne réalisation de la FML tout en évitant un développement rapide de possibles flores d'altérations. Une température plus élevée de $18/20^\circ\text{C}$ reste intéressante pour les vins commercialisés jeunes.

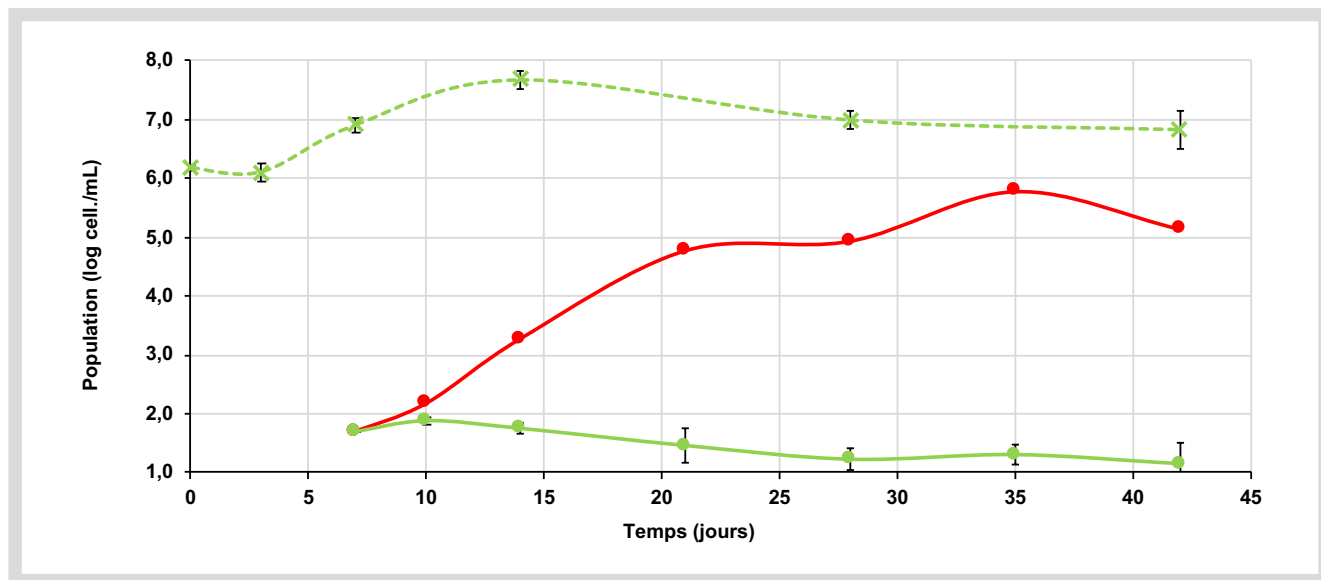


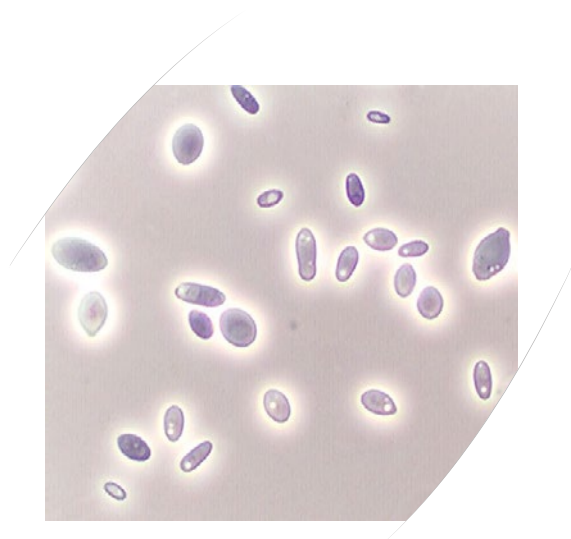
Figure 13 : Évolution d'une faible contamination en *Brettanomyces* (Bret) en présence ou non de bactéries lactiques (moyenne pour 9 souches de BLensemencées à T0) IFV, 2018.

Nouvel intérêt du pilotage de la fermentation malolactique : effet bioprotection contre *Brettanomyces*.

La maîtrise de la réalisation de la FML limite le temps disponible à *Brettanomyces* pour se multiplier. Mais, le vin reste généralement assez riche pour permettre le développement d'une population avec une production active de phénols volatils. Il est donc normalement conseillé de stabiliser le vin à la suite de la FML. Une alternative innovante peut être le maintien de la présence bactérienne. En l'absence de stabilisation, les bactéries lactiques peuvent assurer un rôle de bioprotection vis-à-vis des contaminations en *Brettanomyces*. Exposées à des biomasses données de bactéries lactiques, différentes souches de *Brettanomyces* présentent des inhibitions comparables. Cet effet bioprotection est propre aux bactéries lactiques, tout au moins à *Oenococcus oeni*. Il permet d'éliminer une contamination à la source mais a peu d'effet sur une population développée de *Brettanomyces*. Le suivi de l'acidité volatile renseigne sur l'intérêt de prolonger ou non cette phase de bioprotection.

Les amines biogènes

Dans certaines conditions de fermentation malolactique, les bactéries peuvent produire des amines biogènes, dont certaines sont connues pour leurs incidences sur la santé (cf p.24). Les bactéries lactiques indigènes de l'espèce *Oenococcus oeni* dégradent généralement les acides aminés présents en amines biogènes. En revanche, les préparations bactériennes sélectionnées ne présentent normalement plus ce métabolisme.



Sélection et caractérisation des bactéries

Sélection de souches bactériennes et production des biomasses

Oenococcus oeni est une espèce de bactérie lactique spécifique du vin. D'autres genres sont aussi présents en vinification, notamment *Lactobacillus* et *Pediococcus*. La constitution d'une collection de souches originales prélevées dans le milieu naturel est à la base de la sélection d'une nouvelle bactérie lactique. Les tests de sélection sont alors orientés vers une application œnologique ciblée.

La production d'une biomasse bactérienne s'effectue en trois phases : multiplication cellulaire en conditions favorables, adaptation cellulaire en conditions limitantes, stabilisation par lyophilisation. La maîtrise de cette technologie permet de proposer des biomasses dites à ensemencement direct. Certaines biomasses pour des raisons économiques ou d'activité en conditions extrêmes maintiennent une mise en œuvre plus ou moins complexe.

Caractérisation des bactéries lactiques

Les différentes méthodes de génotypage des souches de bactéries lactiques sont basées principalement sur la méthode d'amplification de l'ADN (PCR) dont il existe plusieurs variantes. La technique 16S ARDRA permet une identification des espèces. Alors que les techniques RAPD, ALFP ou encore VNTR permettent de différencier les souches à des degrés plus ou moins importants.

La sélection de souches pour les levains malolactiques s'appuie sur des critères de sélection génétique avec la détection de « gènes d'intérêt » ou de « gènes d'altération ».

Une des altérations possibles, avec incidence sur la santé, est la production d'amines biogènes à partir de la décarboxylation des acides aminés. Cette production dépend en premier lieu de la quantité d'acides aminés précurseurs qui peut varier fortement d'un vin à l'autre. Les trois principales amines biogènes produites au cours de la FML sont la putrescine, l'histamine et la tyramine avec une incidence possible sur la santé pour les deux dernières. S'assurer de l'incapacité d'une souche sélectionnée à produire ces amines biogènes est donc un atout certain pour le consommateur. La putrescine quant à elle, n'est pas dangereuse pour la santé, mais peut avoir un effet de masque aromatique et réduire la qualité des vins (cf figure 14). Ces métabolismes étant connus, des

analyses génétiques sont réalisées afin de détecter la présence ou non des gènes incriminés dans la formation des amines biogènes.

La dégradation d'un autre acide aminé, l'arginine, entraîne la production de carbamate d'éthyle qui est un composé classé cancérigène. Cette voie métabolique est présente chez environ 2/3 des souches d'*O. oeni* néanmoins les teneurs en carbamate d'éthyle produites par les bactéries sont assez faibles et tout à fait en dessous des limites recommandées dans les produits alimentaires. La détection du gène responsable de la dégradation de l'arginine pour la sélection de souche permet ainsi d'éviter tout risque pour la santé des consommateurs.

Il existe aussi le « caractère filant » qui résulte de la synthèse d'exopolysaccharides (EPS) à partir du glucose grâce à un unique gène codant pour une glucosyl transférase. La production de ces composés induit un aspect huileux et une augmentation de la viscosité. Bien qu'*O. oeni* n'ait jamais été mise en cause dans l'apparition de cette altération, certaines souches possèdent cette voie métabolique. Cette aptitude peut conférer un avantage sélectif dans le vin en protégeant les cellules grâce à la formation d'une capsule. La détection génétique de ce gène peut donc être un bon indicateur dans la sélection de souche d'*O. oeni* tout en vérifiant l'absence d'altération au niveau phénotypique.

En ce qui concerne les gènes d'intérêt, de nombreux travaux sont en cours sur cette thématique afin de rechercher des gènes présents chez les souches dites performantes au niveau fermentaire ou apportant un intérêt aromatique.

Pour ce qui est de l'amélioration du profil sensoriel et aromatique, les bactéries lactiques possèdent des enzymes telles que des glycosidases, estérases ou encore protéases qui permettent la synthèse de composés aromatiques ou la libération de précurseurs aromatiques. De nombreux travaux de recherche sont actuellement menés car les gènes mis en cause ne sont pas tous connus. La détection génétique des gènes codant pour ces enzymes pourrait révéler le potentiel des souches de bactéries lactiques à complexifier le profil aromatique du vin.

La sélection de souches en fonction de l'absence ou présence de ces gènes n'est pour l'instant pas possible, ceci est une perspective en cours de développement.

Témoin positif A B C D E F G H I J K

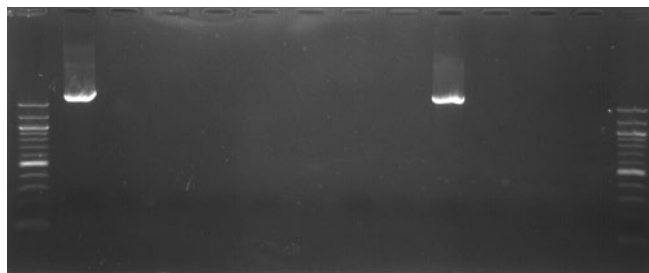


Figure 14 : Détection du gène responsable de la formation de la putrescine - IFV Vertou, 2020.



Chapitre 3

Hygiène, nettoyabilité et environnement pour gérer et diriger la biomasse

La réussite de la mise en œuvre des levains, au chai, passe par la succession d'étapes (acclimatation du levain, entretien du pied de cuve) qui doivent s'accompagner d'une grande rigueur dans leur réalisation. Il convient également de connaître les conditions du milieu pour mieux les maîtriser : état sanitaire et biomasse composant les jus de raisins à fermenter pour le sulfitage, richesse en sucre et éléments azotés ou en acide malique pour le choix de la souche de levure ou de la bactérie lactique. La connaissance de la composition microbiologique initiale du moût, du vin aura son importance (dégradation difficile des derniers grammes de sucres, présence de levures d'altération) même si le rapport d'ensemencement (par le levain ou le pied de cuve) est très largement – en nombre - en faveur du microorganisme que l'on veut implanter. Quand on inocule de telles quantités de microorganismes vivants, qui sont amenés à se multiplier pour mener à bien leur mission, il faut penser à l'ensemble des surfaces qui, intentionnellement ou pas, voient le passage de ces acteurs des processus fermentaires, et pour lesquelles, de fait, on va vouloir imposer de nouveaux acteurs de fermentation à l'occasion du passage d'une autre matrice moût ou vin ou de la récolte suivante.

Ainsi aujourd'hui, préparer les conditions de réussite d'un ensemencement consiste également à préparer les conditions de réussite pour une autre matrice dans le même environnement, à court ou long terme (entre FA et FML, entre deux périodes de vinification). Ceci est valable pour les acteurs principaux des fermentations mais aussi pour d'autres acteurs, plus opportunistes

(traces de sucres, baisse de la pression du SO_2) qui attendent que la place se libère pour survivre puis se multiplier et conduire potentiellement à des altérations. De nouveaux éléments sont apparus ces dernières années quant aux conditions favorisant la survie des microorganismes sur les nombreuses surfaces utilisées dans la filière vitivinicole. La bio-adhésion permet de souligner les forces qui créent les affinités entre les microorganismes et les matériaux. L'étude de la nettoyabilité des matériels confirme les conditions favorables à l'encrassement, à l'origine des biofilms. La modélisation d'un encrassement montre la capacité des microorganismes à résister aux procédures de nettoyage/désinfection et à renforcer leur pouvoir contaminant. Par ailleurs, les évolutions dans les pratiques viticoles (niveau de maturité, pH des moûts et des vins et conséquence sur l'action du SO_2) et œnologiques (niveau de filtration, niveau de SO_2 , vins sans soufre ajouté, élevage sur lies) constituent des conditions encore plus favorables à la pérennisation des microorganismes sur la plupart des surfaces au contact du moût ou du vin. Le travail au chai en conditions confinées et humides soulève la notion d'environnement. Dans un contexte de réduction des intrants, de limitation des effluents (consommation d'eau), il nous appartient de raisonner et optimiser les procédures d'hygiène pour limiter les conséquences d'une pression microbienne ou d'une présence sournoise de microorganismes d'altération afin de favoriser, d'un soutirage à un autre, d'une campagne à une autre, les processus fermentaires, dans le respect de la qualité nutritionnelle et sanitaire des vins.



Une bio-adhésion propre à chaque microorganisme

L'adhésion des microorganismes aux surfaces est le résultat d'interactions physico-chimiques, attractives ou répulsives. Elle se traduit par la création d'une interface microorganisme – surface qui dépend d'un certain nombre de paramètres comme la rugosité, la topographie de la surface, mais aussi les énergies d'interactions à l'origine de l'encrassement des surfaces. Une grande variabilité intra et inter espèce est observée dans le caractère hydrophobe/hydrophile des différentes souches ; le pourcentage d'affinité à l'hexadécane (Figure 15) varie de 0 à 97.6 %. Sur cette base, on obtient des souches hydrophobes (dont *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* ou *Schyzosaccharomyces pombe*), des souches hydrophiles (dont *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* ou *Hanseniaspora guilliermondii* ou *Brettanomyces intermedius*) et des souches intermédiaires (dont *Candida famata* ou *Torulaspora globosa*). Cette variabilité est confirmée par la mesure de la mobilité électrophorétique.

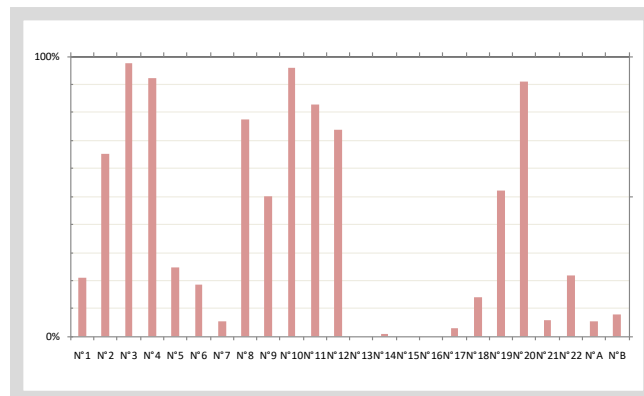


Figure 15 : Pourcentage d'affinité de 24 souches de levure pour l'hexadécane (affinité élevée pour les souches hydrophobes, faible pour les souches hydrophiles) - AgroParisTech UMR Micalis

En conditions dynamiques (circulation en circuit fermé) et maîtrisées (débit, température et durée modulables), l'adhésion est rapide quand on simule un transfert. L'aptitude à former des structures en trois dimensions est confirmée pour la plupart des souches testées ; ces structures sont toutefois souches-dépendantes (cf figure 16) et sont apparues peu sensibles à un préconditionnement des surfaces par du vin. L'adhésion la plus importante est obtenue sur l'acier inoxydable 316 par rapport au verre et au PET. La biocontamination des surfaces dans la filière vinicole dépend non seulement de la nature des matériaux au contact mais également des souches contaminantes. Ces données vont impacter sur les procédures d'hygiène.

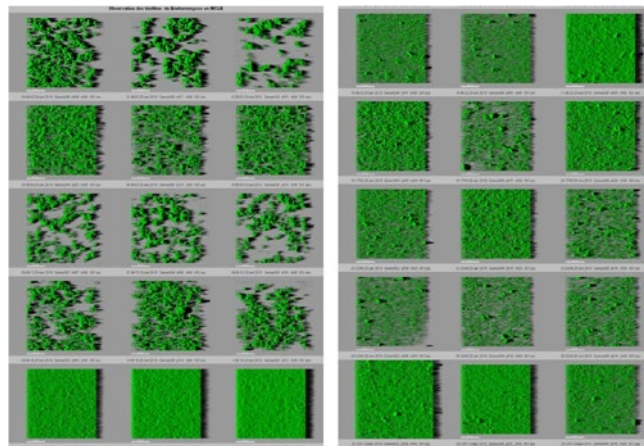


Figure 16 : Biofilms formés par 10 souches de levure à la surface de microplaques (observation au microscope électronique après coloration) - AgroParisTech, UMR Micalis

Nettoyabilité (aptitude au nettoyage) le point faible de la filière...

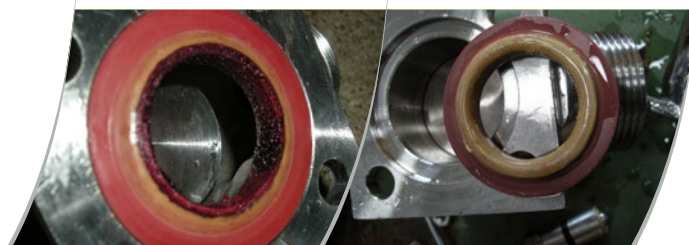
La diversité des matériaux au contact du moût ou du vin est un élément primordial à prendre en compte dans la mise en place des procédures d'hygiène. Elle ajoute, aux phénomènes de bio-adhésion, aux souillures très variées (sucre, tartre), de la complexité dans le choix des procédures les plus pertinentes. Force est de constater que des matériaux comme le bois ou le béton – matériaux pour lesquels on note un regain d'intérêt pour la réalisation des fermentations – sont difficiles à nettoyer et encore plus à désinfecter. En modélisation sur circuit-test l'efficacité des procédures est limitée si des mesures complémentaires ne sont pas mises en œuvre (Figure 17) ; l'effet d'un démontage rend ainsi plus probable le contact du détergent ou désinfectant avec les surfaces « critiques » et la pression microbienne résiduelle est

moindre, limitant lors d'un transfert, un soutirage, une aération, les populations résiduelles (les mêmes pompes et tuyaux sont utilisés pour les mêmes opérations œnologiques...). Cet effet bénéfique a été validé sur sites (photos 1 et 2).

De même, l'état et l'usure des surfaces qui sont en contact avec les moûts en fermentations favorisent les phénomènes de bio-adhésion, d'encrassement : les joints (vannes, porte et couvercle), les soudures, le robinet de dégustation... L'ensemble de ces surfaces (< 1% de la surface totale au contact du moût) est un facteur qui s'ajoute à la faible nettoyabilité de nos installations. Procéder à leur remplacement régulièrement permet de limiter les populations résiduelles en microorganismes.

Points critiques	Bilan après soutirage	Après procédure stricte	Après procédure adaptée
Vanne 1			
Coude inox			
Piquage 1			
Piquage 2			
Vanne régulation 2			
Purge 1			
Purge 2			
Vanne 3			
Manchon inox			

Figure 17 : Effet d'une procédure avec et sans démontage sur le niveau d'hygiène (en ATP : < 100 RLU ; 100 < RLU < 500 ; > 500 RLU) des surfaces contrôlées, en modélisation (circuit-test), IFV Amboise, 2012



Photos 1 et 2 : Vanne de cuve et son joint démontés pour nettoyage IFV Amboise, 2016.

À retenir

- La plupart des microorganismes du moût et du vin présentent un pouvoir bio-adhésif important sur la plupart des surfaces (surtout l'acier inoxydable), et un comportement bio-adhésif propre,
- Les microorganismes d'altération - ou non - peuvent résister à une procédure de désinfection et recontaminer – par le matériel – un autre vin,
- Cette survie est facilitée par la présence de points critiques, difficiles à atteindre,
- Le temps et la température sont des facteurs favorisant l'adhésion.

Des procédures adaptées, des effluents limités

La plupart des microorganismes de la filière, qu'ils soient d'altération ou pas, présentent des aptitudes à l'adhésion sur la plupart des surfaces avec lesquelles ils sont en contact, notamment pendant les phases fermentaires. Pour, à plus ou moins long terme, mettre ces surfaces en condition de recevoir une autre matière première, il convient d'éliminer toute trace résiduelle d'un passage antérieur d'une précédente vendange, d'un autre moût en fermentation. C'est le rôle des étapes de nettoyage et de désinfection. Pour casser les forces d'adhésion créées entre les souillures, qu'elles soient organiques, minérales ou microbiennes, et les surfaces, il faut mettre en place des forces d'arrachement supérieures. Les paramètres utilisés dans les chais sont connus et appliqués de tous : action mécanique, chimique, thermique, action tensioactive ou surfactante, temps de contact, détergence et désinfection. Le rôle de l'hydrodynamie (turbulence, pouvoir mouillant et séquestrant) est de conduire au détachement des souillures et leur élimination. Pour cela, il convient, en plus d'adapter ces paramètres (chimie, chaleur, action mécanique) à la nature de la souillure et celle du matériau, de s'assurer que l'ensemble des surfaces

puissent être traitées. C'est là que les avancées sont les plus significatives pour la filière, aidées de ce qui se fait en industrie agroalimentaire (photo 3). La moyenne pression, le canon à mousse permettent d'atteindre plus facilement et de façon plus efficace certaines surfaces du chai. La mesure de la conductivité permet de limiter les volumes d'eau pour les phases de rinçage. Elles sont complémentaires au démontage (pour une cuve de fermentation) pour réduire au maximum les souillures résiduelles des surfaces au contact du moût, vin, et des surfaces environnant les phases fermentaires (murs, sols) qui sont aussi des vecteurs de microorganismes. La qualité de l'eau utilisée est importante également.



Photos 3

Le jet rotatif assure, lors d'un nettoyage de fin de fermentation, un accès du détartrant, détergent ou désinfectant à un maximum de surface dans les meilleures conditions.

IFV Amboise, 2019

L'optimisation des procédures (paramètres hydrodynamiques, accès à un maximum de surfaces) est une source d'économie de temps, de consommable. C'est aussi un point essentiel pour l'intégrité des surfaces et pour limiter l'adhésion. C'est, enfin, une démarche qui doit permettre de réduire les volumes d'eau utilisés et les effluents produits. Elle est aidée en cela par un certain nombre d'innovations (pousse à l'eau des canalisations, nouveaux matériaux), et incite la recherche à impliquer les constructeurs de matériel dans le domaine de la conception hygiénique. Le contexte environnemental nous autorise dès aujourd'hui à envisager la réutilisation d'une certaine partie des eaux – les moins polluantes : eaux de rinçage – pour des prélavage ou l'hygiène des surfaces qui ne sont pas en contact avec le vin.

LES BONNES PRATIQUES D'HYGIÈNE DANS LA GESTION D'UN LEVAIN

Limiter les phénomènes d'adhésion

- Prélavage à l'eau des matériels très rapidement après utilisation
- Préserver l'intégrité des surfaces (éviter l'usure par contact, les chocs, favorisant l'adhésion)
- Aucun matériel ne doit être négligé (pompe, tuyau, joints) après les opérations de transfert
- Changer les pièces usagées (joints) régulièrement

Adapter la procédure

- A la souillure et au niveau d'encrassement
- Avec les outils adaptés pour un effet optimum
- Avec des solutions compatibles avec la nature des matériaux (solutions chimiques, chaleur)
- Nettoyer avant de désinfecter

Favoriser l'accès du détergent/désinfectant à un maximum de surfaces

- Démonter quand c'est possible (pompe, joints, raccords) et procéder au trempage des pièces

Ne pas oublier le risque lié aux opérateurs et à l'environnement (murs, sols), les moyens de protection

Valider les opérations de nettoyage et désinfection (contrôle visuel, bandelettes) et penser à la traçabilité (mode opératoire, outil, paramètres hydrodynamiques, nature des produits)

Bibliographie

Pour plus de données scientifiques sur la biodiversité des levures

- **J-M. Belin, 1979**, Contribution à l'étude des levures des chais – taxonomie, répartition des levures
- **P. Chretien, 2001**, Etude de la dissémination des levures industrielles dans l'environnement des caves vinicoles
- **M. Coarer, 1999**, F. Charrier, A. Poulard, Microflore et Typicité des Vins
- **C. Grangeteau, 2016**, Biodiversité fongique du raisin au vin : impact de l'activité anthropique
- **J-L Legras, 2003**, Etude de la flore levurienne de différents terroirs alsaciens
- **M. Lollier, 2003**, Diversité, évolution et transferts de la vigne au vin des flores levuriennes indigènes d'intérêt œnologique en Alsace
- **A. Poulard, P. Chretien, A. Lamberts, A. Pain, M. Coarer, 2007**, Dissémination des levures industrialisées dans l'environnement viti-vinicole des caves
- **V. Renouf, C. Miot-Sertier, P. Strehaiano, A. Lonvaud-Funel, 2006**, Le consortium microbien du vin : une réelle caractéristique du terroir
- **F. Vezhinet, J-N. Hallet, M. Valade, A. Poulard, 1992**, Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification
- **B. Vincent, 2002**, Connaissance des micro-organismes présents au cours de l'élaboration des vins rouges et blancs de Bourgogne
- **B. Vincent, M. Coarer, A. Pain, 2011**, *Brettanomyces bruxellensis* : Biodiversité et conséquences
- **Gerbaux V. et Thomas J., 2017**, Incidence œnologique de la microflore du raisin à maturité. Rev. des Oenol., 165, 33-35.
- **Poupault, J-M.Desseigne, C.Hermon, C.Dupéroux, 2019** - Gestion de l'eau et effluents vinicoles, Conférence Euroviti du Sival, à Angers

Pour plus de données scientifiques sur les fermentations alcooliques

- **E. Vinsonneau, M.-C. Colosio, M. Coarer, P. Cottureau, M. Bely, I. Masneuf, C. Miot-sertier, J. Maupéu, A. Vallet-Courbin, S. Becquet, V. Pladeau, 2016**, Fermentation indigène et pied de cuve : Résultats du Projet Casdar "Levains Bio", Rev. des CEnologues n°161
- **P. Lucas, I. Masneuf, J. L. Legras, M. Bely, C. Miot-Sertier, O. Claisse, M. El Khoury, H. Campbell-Sills, M. Börlin, J. Maupéu, A. Vallet-Courbin, V. Pladeau, S. Becquet, M. Chovelon, R. Bauduin, P. Cottureau, M. Coarer, E. Vinsonneau, M.C. Colosio, 2018**, Des outils pour fiabiliser les fermentations des vins et cidres biologiques en utilisant les levures et bactéries indigènes. Innovations Agronomiques, 63, 279-291

Pour plus de données scientifiques sur la bioprotection

- **Pladeau V, et al. 2019**, Bioprotection et gestion des fermentations alcooliques en bio. Brochure SUDVINBIO, SUDVINBIO : 40
- **Windholtz, S., et al. 2019**, "Bioprotective non-*Saccharomyces* yeast as an alternative to sulfites for the winemaking process." Oeno Ivas

Pour plus de données scientifiques sur la nettoyabilité

- **M-N Bellon-Fontaine, T. Bénézech, K. BOUTROUX et C. Hermon 2016**, Conception hygiénique de matériel et nettoyage - désinfection pour une meilleure sécurité en industrie agroalimentaire - sous la coordination, Sciences et Techniques AgroAlimentaires, Lavoisier
- **P. Poupault, J-M.Desseigne, C.Hermon, C.Dupéroux 2019**, Gestion de l'eau et effluents vinicoles, Conférence Euroviti du Sival, à Angers
- **P. Poupault, C. Hermon 2019**, Microorganismes d'altération et contamination des vins : technologie innovante pour modéliser une cinétique d'adhésion et optimiser la désinfection. Communication Poster Oeno 2019, 11^{ème} Symposium International d'œnologie, Bordeaux

REMERCIEMENTS

Les données présentées sont issues des travaux des unités IFV et de leur collaboration avec les partenaires de la filière.

- IFV - Institut Français de la Vigne et du Vin
- ISVV - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, unité de recherche œnologie (EA 4577), Université Bordeaux Segalen, IPB
- IFPC - Institut Français des Productions Cidricoles
- Microflora - ISVV, Villenave d'Ornon
- ITAB - Institut Technique de l'Agriculture Biologique
- SudVinBio
- SVBNA - Syndicat des Vignerons Bio de Nouvelle Aquitaine
- CAB Pays de la Loire. Coordination Agrobiologique des Pays de la Loire
- SEDARB - Service d'Écodéveloppement Agrobiologique et Rural de Bourgogne

CERTAINS RÉSULTATS SONT ISSUS DE PROJETS RÉCENTS :

- Projet CASDAR "Levains bio"
- Projet européen FP7 WILDWINE
- Feder Pays de la Loire "Hybridation des levures"
- Feder Pays de la Loire "Caractérisation et sélection des bactéries"
- Projet Pays de la Loire Centre "non-Saccharomyces"
- Projet FranceAgriMer "Lutte contre *Brettanomyces*"
- Projet FranceAgriMer "Hygiène des surfaces"
- Projet FranceAgriMer "MICRODIV"

POUR EN SAVOIR PLUS

- <https://www.sudvinbio.com/>
- <https://www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr/>
- <https://www.isvv.u-bordeaux.fr/fr/>
- <https://www.vignevin.com/>

INSTITUT FRANÇAIS
DE LA VIGNE ET DU VIN

ITINÉRAIRES N° 30

Comité de rédaction :

IFV : J. Beguin, M. Coarer,
M-C. Colosio, P. Cottureau,
V. Gerbaux, E. Heguiaphal,
P. Poupault, E. Vinsonneau
ISVV : I. Masneuf-Pomarede,
P. Lucas

SudVinBio : V. Pladeau

VBNA : S. Becquet

Crédits photos :

IFV, Adobe Stock

AVEC LE SOUTIEN DE :

