

Stratégies de limitation des sulfites dans les vins – Quelles alternatives?

Partie 1/3 : L'axe microbiologique, bioprotection et étapes préfermentaires

Olivier Pillet¹, François Davaux², Philippe Gabillot³, Stéphanie Peyrot⁴, Anthony Silvano⁵, Bertrand Robillard¹

¹ Institut œnologique de Champagne – Épernay – France.

² Institut français de la Vigne et du Vin – Lisle-Sur-Tarn – France.

³ Chambre d'agriculture Indre-et-Loire – Chambray-Les-Tours – France.

⁴ Euralis – Izon – France.

⁵ Lallemand SAS – Blagnac – France.

Introduction

Le dioxyde de soufre est un auxiliaire technologique devenu d'utilisation évidente en œnologie tant ses bienfaits sont cruciaux, que ce soit en termes de contrôle microbiologique qu'en prévention des phénomènes d'oxydation.

Le SO₂ est cependant pointé du doigt depuis quelques années, en raison de ses nombreux inconvénients :

- toxique pour l'organisme humain, il présente un danger pour le consommateur de vin et pour le manipulateur en cave ;
- précurseur possible d'arômes soufrés négatifs dits « de réduction » produits lors des fermentations (Henschke et Jiranek, 1991) ;
- ou encore pouvant être oxydé en sulfate, auquel on impute parfois l'apparition d'une sécheresse en bouche ; il peut également provoquer la formation plus importante par la levure d'éthanal, autre molécule potentiellement indésirable (Cleroux et al., 2015) ;
- son odeur est perceptible et/ou peut masquer certains arômes positifs du vin (Peynaud et Blouin, 1991) ;
- en se combinant aux anthocyanes, pigments des vins rouges et rosés, il provoque leur décoloration partielle, certes réversible.

Pour ces raisons, de nombreuses recherches visent à réduire son utilisation en œnologie et à lui trouver des alternatives. Dans cette première partie, nous nous attacherons à évaluer quelques

outils biotechnologiques alternatifs issus d'une approche essentiellement microbiologique pour gérer les phases préfermentaires. En effet, durant la période qui s'étend de la récolte à l'entrée en fermentation du moût, une flore indigène est susceptible de se développer, au sein de laquelle peuvent s'exprimer des métabolismes indésirables quant à la qualité finale du vin et sa définition sensorielle : production d'acide acétique, d'amines biogènes, de phénols volatils, ou encore difficulté d'implantation de la levure œnologique inoculée par la suite pour réaliser la fermentation alcoolique (FA). Le SO₂, sous sa forme moléculaire H₂SO₃, représente alors un levier incontestable pour gérer ces risques (Deveze, 1977). On admet qu'un niveau de SO₂ moléculaire de 0,5 mg/L est bactéricide, le niveau nécessaire pour l'effet fongicide est généralement considéré comme étant plus élevé. Usseglio-Tomasset (1995) a montré que pour retarder la FA de 50 heures, 0,5 mg/L de SO₂ actif était nécessaire face à *Saccharomyces cerevisiae* et 3,5 mg/L face à *Saccharomyces uvarum*. Le pH joue un rôle déterminant puisque plus il est élevé, plus la proportion de SO₂ moléculaire est faible. Une température basse de même que l'absence d'éthanol, conditions rencontrées en phases préfermentaires, diminuent également fortement l'activité du SO₂. À ce titre, la mise en œuvre de stratégies de lutte microbiologique

au moyen de micro-organismes sélectionnés pourrait s'avérer une alternative d'intérêt pour limiter des sulfitages trop importants ou pallier à leur inefficacité dans certains cas.

Levure fractionnée de levures *S. cerevisiae* en macération préfermentaire de raisins noirs

Une première stratégie pour limiter ces risques est d'inoculer au plus tôt la levure *S. cerevisiae* choisie pour réaliser la FA. Cependant, en situation – fréquente – de macération préfermentaire à une température supérieure à 10 °C, des départs trop précoces en fermentation peuvent survenir en cas d'un levurage à pleine dose (20-25 g/hL) à l'encuvage, nuisant au travail d'extraction en phase aqueuse recherché par le vinificateur dans ce type de processus. Une alternative parfois

Faites confiance à la nature
pour protéger votre moût



Gaïa™

UNE LEVURE INNOVANTE POUR LA PROTECTION NATURELLE

L'utilisation de Gaïa™ pendant les étapes préfermentaires (telles que la macération préfermentaire à froid) fournit une protection naturelle contre les micro-organismes d'altération, la levure *Metschnikowia fructicola* réprimant le développement de populations et métabolites indésirables (comme l'acidité volatile). En conséquence, les sulfitages lors de ces étapes peuvent être limités. Le très faible pouvoir fermentaire de Gaïa™ permet de travailler en toute sécurité pendant l'extraction préfermentaire, sans déclencher trop précocement la fermentation.




recommandée à ce levurage précoce est le levurage fractionné en deux temps, consistant à inoculer une faible dose de levure avant macération préfermentaire (MP) pour sécuriser microbiologiquement le milieu sans déclencher la FA, puis d'inoculer une plus forte dose lorsque l'extraction voulue en phase aqueuse est atteinte.

Nous avons comparé ces deux protocoles à un levurage pleine dose différé, c'est-à-dire réalisé à la fin de MP, sur une vendange de Pinot noir réalisant une MP de 4 jours à 14 °C. En fin de MP, juste avant la seconde inoculation en fractionné ou la pleine inoculation en différé, des numérations levuriennes ont été réalisées. Les résultats (figure 1) montrent que plus l'inoculation est réalisée précocement, meilleure est la répression de la population non *Saccharomyces* indigène. La modalité levurage en fractionné permet à ce titre un niveau de répression intermédiaire, dont on ne peut complètement se satisfaire. Il serait donc préférable de contrôler la microflore le plus tôt possible avec une levure sélectionnée apportée en plus grande quantité mais non susceptible de lancer la FA trop précocement, ou encore de s'assurer d'avoir une température de MP plus basse ne permettant un départ en FA.

Utilisation de *Torulaspora delbrueckii* en opération préfermentaire sur moût blanc

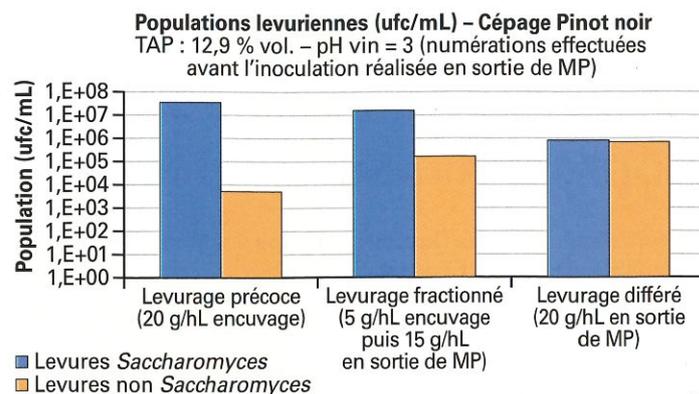
Une seconde tentative a concerné une approche de bioprotection des moûts blancs au moyen d'une levure non *Saccharomyces* issue de l'espèce *Torulaspora delbrueckii*, naturellement présente mais non majoritaire dans le moût. La levure retenue pour ces expérimentations, Biodiva™, présente en effet des caractéristiques intéressantes : faible production d'acidité volatile et autres métabolites indésirables, cryotolérance sans cryophilie. Ce dernier point est essentiel pour le processus envisagé. Cette souche de *T. delbrueckii* peut ainsi s'implanter des moûts placés à basse température (à partir de 5 °C) sans subir de perte importante de population mais nécessite des températures élevées (>15 °C) pour démarrer la FA. Elle permet ainsi d'assurer un contrôle microbiologique précoce (par exemple par inoculation du jus en sortie de pressurage) sans enclencher par elle-même la FA sur bourbes.

Une expérimentation a ainsi été réalisée sur moût de Sauvignon, dans le chai expérimental d'IFV Sud-Ouest, à Lisle-sur-Tarn, comparant 3 modalités :

- un témoin sulfité à 5 g/hL au remplissage de la cuve de débouillage ;
- le même moût non sulfité mais additionné d'une formulation antioxydante à base de levures inactivées ;
- le même moût non sulfité, additionné d'une formulation antioxydante à base de levures inactivées, et inoculé avec Biodiva™ (7 g/hL – 3,5.10⁶ cellules/mL).

Les trois modalités ont été laissées en débouillage à 5 °C pendant 15 jours, avec enzymage (Inozyme Clear, 4 g/hL). Les populations levuriennes ont alors été dénombrées en fin de sédimentation, au débouillage (figure 2). Le sulfitage montre clairement son efficacité pour limiter le développement de levures potentiellement contaminantes, qu'elles soient *Saccharomyces* ou non *Saccharomyces*. Néanmoins l'inoculation avec Biodiva™ a également montré une forte propension à endiguer le développement de contaminants du genre *Saccharomyces*, équivalente à celle du sulfitage, tandis que la flore non *Saccharomyces* retrouvée correspond à la population de *T. delbrueckii* qui a été inoculée. Cette levure représente donc un outil certain pour la bioprotection préfermentaire des moûts, elle nécessite pour cela, en revanche, une maîtrise de la température du moût (au moins inférieure à 12 °C) afin d'éviter son départ en FA intempestif.

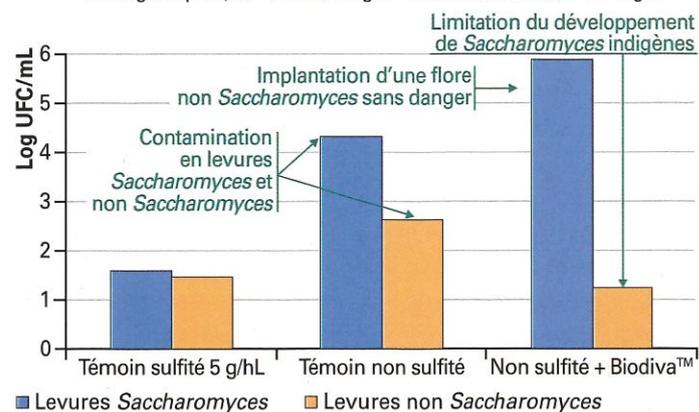
■ **Figure 1 : Populations levuriennes dénombrées sur milieu gélosé en sortie de macération préfermentaire (MP) de raisins noirs en fonction du moment d'inoculation en levures.**



■ **Figure 2 : Biocontrôle des populations levuriennes sur moût blanc par l'utilisation préfermentaire de *Torulaspora delbrueckii*. Dénombrement sur milieu YPD avec chloramphenicol – Levures totales : 25 °C pendant 5 jours – Levures *Saccharomyces* : 35 °C pendant 2 jours.**

Niveaux de populations levuriennes après débouillage : effet d'un ensemencement prédébouillage avec *T. delbrueckii* (Biodiva™ – 7 g/hL – 3,10⁶ cellules/mL)

Sauvignon pH 2,93 – Sucres 160g/L – Azote assimilable = 177 mg/L



■ **Tableau 1 : Activité de *Kloeckera apiculata* dans un moût de Pinot noir avec ou sans biocontrôle avec Gaïa™ (d'après Gerbaux et al., 2015). Moût pasteurisé : sucres 230 g/l, pH 3,20, pas de SO₂ – MP 7 jours à 15 °C puis inoculation avec *Saccharomyces cerevisiae* – FA à 20/24 °C.**

Acide acétique (g/L)	T. 7 j. (fin MP)	T. 14 j. (fin FA)
Témoin non contaminé	0,02	0,35
Contamination en <i>Kloeckera</i>	0,31	0,67
Contamination en <i>Kloeckera</i> + biocontrôle avec Gaïa™	0,10	0,36

Utilisation de *Metschnikowia fructicola* en opération préfermentaire sur vendange rouge

Macération préfermentaire à froid

Dans certaines situations de macération préfermentaire dites « à froid », les températures sont parfois moins maîtrisées

et avoisinent plus les 12-16 °C que les 8 °C préconisés en véritable préfermentaire à froid. Pour cette raison, IFV Beaune a sélectionné une levure *Metschnikowia fructicola* sans pouvoir fermentaire, Gaïa™, afin d'offrir un biocontrôle massif, avec un fort niveau de population (dosage à 20 g/hL – de l'ordre de 9 10⁶ cellules/mL), tout en limitant le risque de départ précoce en FA.

L'espèce de levure *M. fructicola*, isolée récemment sur raisin (Kurzman et Droby, 2001), a déjà été remarquée pour l'inhibition qu'elle exerce en cultures fruitières sur des moisissures (Liu et al., 2011) et sur *Botrytis*. L'utilisation de Gaïa™ en œnologie pour la macération pré-fermentaire des raisins noirs a déjà été décrite par Gerbaux et al. (2015), mais vaut qu'on rappelle ici certaines de ses qualités :

- excellent pouvoir d'implantation et de multiplication sans pouvoir fermentaire ;
- répression du développement des levures *Kloeckera apiculata*, responsables fréquentes des augmentations d'acidité volatile (AV) en MP – *Kloeckera* peut aussi produire environs dix fois plus d'acétate d'éthyle que *Saccharomyces* (Blondin, 2011) ;
- limitation de l'AV en situations de contamination par *Kloeckera* (tableau 1) ;
- absence de métabolites indésirables et meilleure aptitude sensorielle que les autres (*Metschnikowia* testées dans le programme de sélection).

Une expérimentation additionnelle menée en petits lots de 3 kg de vendange a été menée sur Syrah dans le Vaucluse. Elle a consisté à comparer les pratiques suivantes :

- témoin sulfitage classique (6 g/hL sur raisin avant foulage/éraflage) ;
- modalité double sulfitage (en plus du sulfitage initial, ajout de 6 g/hL de SO₂ supplémentaires après un jour de MP à 10 °C) ;
- modalité Gaïa™ : aucun sulfitage, mais inoculation de Gaïa™ (20 g/hL sur raisin avant foulage/éraflage).

Après MP à 10 °C durant 48 heures, un dénombrement des levures totales et non *Saccharomyces* a été réalisé par le laboratoire du service technique d'Inter-Rhône, puis les lots ont été ensemencés avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* IOC 18-2007 (20 g/hL). La population relevée correspond essentiellement à des levures non *Saccharomyces* (tableau 2).

■ **Tableau 2 : Dénombrements de populations levuriennes réalisés après MP (10 °C pendant 48 heures) – Syrah – Vaucluse – sucres = 203 g/L.**

Modalité	Levures totales (ufc/mL)	Levures non <i>Saccharomyces</i> (ufc/mL)	Type des levures non <i>Saccharomyces</i> observées au microscope
Vendange initiale	4,9 x 10 ³	7,3 x 10 ³	
Témoin simple sulfitage 6 g/hL	2,5 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	<i>Hanseniaspora</i>
Témoin double sulfitage 6 + 6 g/hL	1,5 x 10 ⁵	9,4 x 10 ⁴	<i>Hanseniaspora</i>
Non sulfité Gaïa™	3,5 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁷	97 % <i>Metschnikowia</i> – 8,5 x 10 ⁶ autres

Le double sulfitage permet une chute importante de cette population potentiellement contaminante. On observe une population importante de levures non *Saccharomyces* sur la modalité Gaïa™ ce qui est cohérent avec une excellente implantation et multiplication de la levure *M. fructicola* inoculée, puisque c'est essentiellement ce genre de levures qu'on identifie par observation morphologique au microscope. Sur les deux témoins sulfités, en revanche, on note une présence importante de levures identifiées comme étant du genre *Hanseniaspora*, connu pour posséder un potentiel important de production d'acide acétique et d'éthanal (Lonvaud-Funel et al., 2010). À ce titre, la répression de cette flore par *M. fructicola* semble meilleure ou au moins équivalente au sulfitage initial à 6 g/hL.

Biocontrôle de la vendange lors de la récolte

Une utilisation plus précoce a été testée récemment. Nous avons réalisé deux expérimentations sur sites viticoles mettant en œuvre l'addition de Gaïa™ sur raisins et jus frais dans les bennes de vendange. L'ajout de la levure à la dose de 20 g pour 100 kg de vendange, préalablement réhydratée dans de l'eau à 20 °C-30 °C, a été réalisé de manière homogène au remplissage des bennes. Cette pratique a été comparée à des témoins sulfités ou non. Pour s'assurer de l'homogénéité – tant analytique que microbiologique – de la matière première entre les différents lots, la vendange a été effectuée par rang alterné pour le remplissage des bennes. Dans toutes les modalités, une levure

S. cerevisiae (IOC R 9008) a été inoculée (20 g/hL) après une macération pré-fermentaire d'une nuit pour enclencher la FA.

Le premier essai, réalisé sur Merlot en Gironde en partenariat avec le groupe Euralis, a permis de comparer l'itinéraire traditionnel avec sulfitage à une modalité sans sulfitage mais avec ajout de Gaïa™. Sur cette seconde modalité, un léger sulfitage (2 g/hL) a cependant été opéré aux 2/3 de la FA par sécurité. Le suivi des populations levuriennes (figure 3 A) fait état d'une activité de biocontrôle assurée par *Metschnikowia fructicola*. On remarque à l'encuvage une forte population de levures non *Saccharomyces* reflétant la très bonne implantation de Gaïa™, tandis qu'en sortie de MP, les levures *S. cerevisiae* contaminantes apparaissent réprimées par Gaïa™. Ceci se traduit aux 2/3 de la FA par un meilleur développement des *S. cerevisiae* sélectionnées dans cette modalité.

Le second essai, mis en œuvre sur Cabernet franc en partenariat avec la chambre d'Agriculture d'Indre-et-Loire, a permis de comparer 4 modalités : un témoin sulfité classiquement, un témoin non sulfité, une modalité non sulfitée mais avec ensemencement en Gaïa™ sur les bennes et enfin une modalité qui lui est identique à ce stade, mais diffère ensuite par un ajout de bactéries œnologiques en début de FA. De

OENOFRANCE
www.oenofrance.com

Comment diminuer la concentration en métaux lourds et préserver le potentiel aromatique de mon raisin ?



DIWINE® Thiol

Un auxiliaire de vinification original et innovant pour préserver les thiols

- Réduit la concentration en métaux lourds
- Fixe le cuivre responsable de la destruction des molécules aromatiques de type thiols
- Protège contre l'oxydation et prévient les phénomènes de vieillissements prématurés

DIWINE® 2+/3+

Un produit de collage novateur qui permet de réduire la concentration en métaux lourds dans les moûts et les vins

- Permet d'éviter les casses en bouteille
- Remplace efficacement les anciennes méthodes d'élimination du cuivre et du fer

SAS SOFRALAB - 79, av. A. A. Thévenet - CS 11031 - 51530 MAGENTA - FRANCE
Tél. : + 33 3 26 51 29 30 - Fax : + 33 3 26 51 87 60

Figure 3: Biocontrôle par *Metschnikowia fructicola* des populations levuriennes en situation préfermentaire. **A** Essai sur Merlot - Gironde - TAV 14,3 % vol. - pH 3,5 - Dénombrements non *Saccharomyces* sur milieu gélosé, *Saccharomyces* par qPCR, réalisés par Microflora. **B** Essai sur Cabernet franc - Indre-et-Loire - TAV 12,1 % vol. - pH 3,25 - dénombrements levures totales sur milieu gélosé (25 °C pendant 5 jours) réalisés par le laboratoire de Touraine.

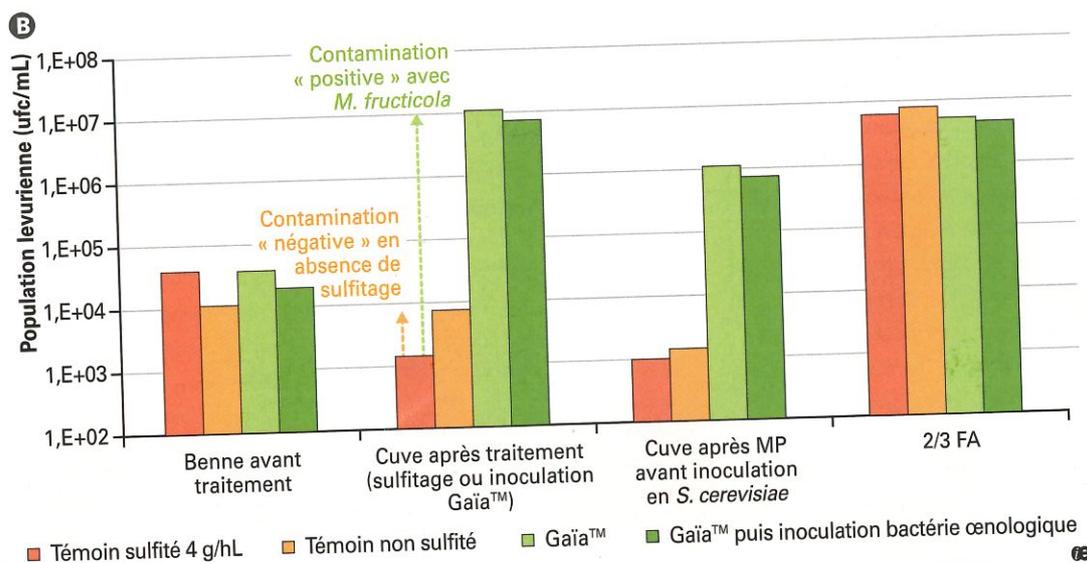
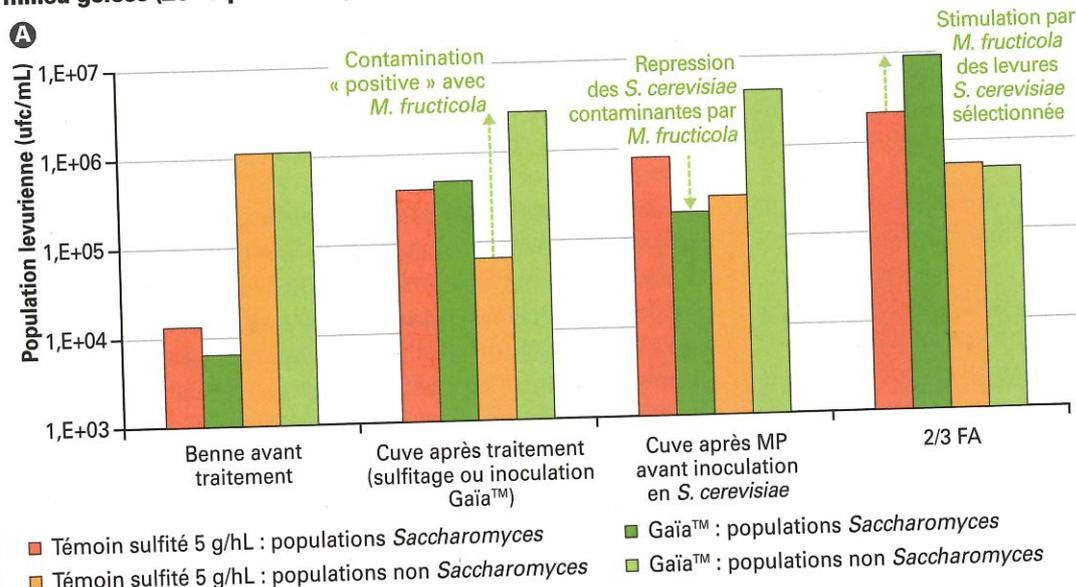
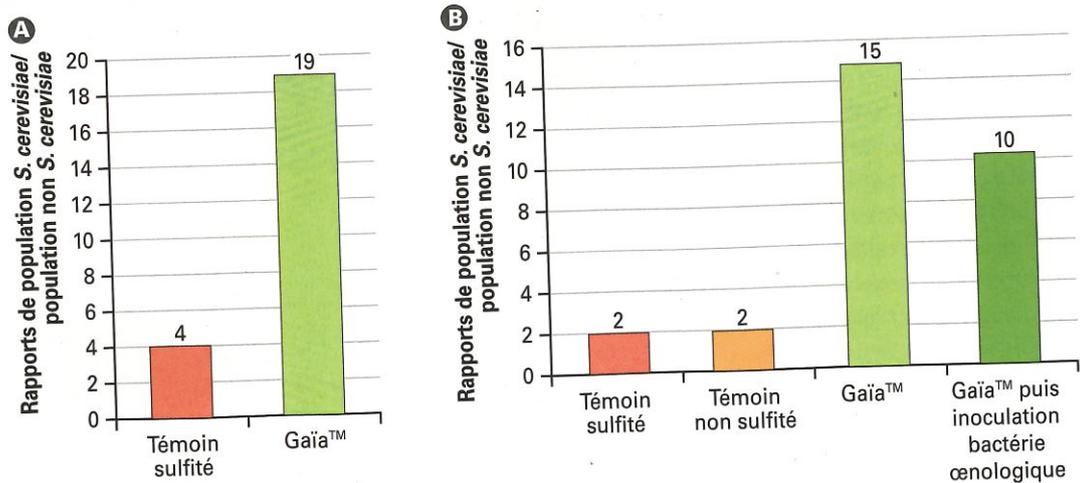


Figure 4: Ratio des populations de levures *Saccharomyces*/non *Saccharomyces*, dénombrées aux 2/3 de la FA, sur les deux essais. **A** Essai sur Merlot - Gironde - TAV 14,3 % vol. - pH 3,5 non *Saccharomyces* sur milieu gélosé, *Saccharomyces* par qPCR, réalisés par Microflora. **B** Essai sur Cabernet franc - Indre-et-Loire - TAV 12,1 % vol. - pH 3,25 - Levures *Saccharomyces* et non *Saccharomyces* sur milieu gélosé réalisés par le laboratoire de Touraine.



nouveau (figure 3 B), on retrouve la très bonne implantation de levures non *Saccharomyces* imputables à *M. fructicola* à l'encuvage, tandis que le témoin non sulfité montre quant à lui une contamination potentiellement négative, avec une population non *Saccharomyces* qui s'est développée davantage qu'en présence de sulfites. Aux 2/3 de la FA, il est intéressant de constater dans les deux essais que *M. fructicola* Gaïa™ permet un ratio de développement *S. cerevisiae*/non *Saccharomyces* qui est en faveur de la levure *S. cerevisiae* sélectionnée que l'on cherche à implanter pour la FA (figure 4). Cette observation tend à montrer qu'en exerçant une répression de la flore indigène contaminante, *M. fructicola* permet indirectement un meilleur développement de la levure sélectionnée pour la fermentation, sécurisant donc cette étape de la vinification.

Conclusion

Face au pouvoir antifongique du sulfitage dans les étapes préfermentaires, certaines levures non *Saccharomyces* représentent une alternative intéressante pour maîtriser la flore microbiologique peuplant le moût et la vendange lors des étapes préfermentaires et ce, dès la récolte du raisin. À cet égard, la levure Gaïa™, une *M. fructicola*, a démontré à plusieurs reprises son efficacité certaine à contrôler, en remplacement partiel voire total du dioxyde de soufre, une partie de la microflore potentiellement contaminante du raisin, que ce soit en macération préfermentaire ou lors d'une utilisation plus en amont, par inoculation des raisins tout juste vendangés.

NDLR: Les références bibliographiques concernant cet article sont disponibles sur simple demande auprès de la Revue des Œnologues.
- Par courrier: joindre une enveloppe affranchie, avec les références de l'article
- Sur internet: www.oeno.tm.fr

NDLR: La deuxième partie de cet article sera publiée dans le n° 161 (octobre 2016) et la troisième partie dans le n° 162 (janvier 2017), de la Revue des Œnologues.