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

Partie 2/3: L'axe microbiologique – les fermentations

Olivier Pillet¹, José-Maria Heras Manso², Bertrand Robillard¹

- 1 Institut Œnologique de Champagne Épernay France.
- ² Lallemand Península Ibérica Madrid Espagne.

Introduction

La première partie de cet article (Revue des œnologues n° 160, juillet 2016, p. 21) a exposé différentes alternatives vis-à-vis de l'utilisation du SO₂ lors des étapes préfermentaires, à partir de la récolte de vendange fraîche, par rapport à son rôle de stabilisant microbien.

Le rôle des micro-organismes quant à la limitation des teneurs en sulfites s'étend évidemment bien au-delà des étapes préfermentaires puisque les fermentations peuvent y jouer une part essentielle. Cette seconde partie va détailler l'ampleur de ce rôle et les techniques fermentaires aujourd'hui à disposition du vinificateur pour limiter les concentrations en SO₂ des vins.

La maîtrise de la fermentation alcoolique: lutter contre la production de SO₂ et de combinants

Les levures œnologiques sont susceptibles de produire des quantités significatives de SO₂ pendant la fermentation alcoolique (FA). Elles peuvent en produire de quelques mg/L jusqu'à plus de 90 mg/L, selon les conditions de fermentations et la souche de levure.

Facteurs aggravant la production de SO₂ pendant la fermentation

Le dioxyde de soufre est un métabolite levurien intermédiaire dans la voie d'assimilation des sulfates, conduisant à la synthèse d'acides aminés soufrés (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Dans certaines conditions, il peut être synthétisé en excès et libéré dans le milieu (Eschenbruch, 1974; Eschenbruch et Bonish, 1976; Wainwright, 1970). Par exemple, on sait que des températures de fermentation basses, ainsi que des turbidités élevées augmentent la production de SO₂ par les levures (Blateyron-Pic et al., 2011). De la même manière un sulfitage important du moût provoque aussi une production plus importante de SO₂ par la levure, mais également d'éthanal, principale molécule se combinant au SO₂ et en diminuant donc l'efficacité technologique.

Un facteur très important mais sous-estimé est l'impact de la teneur en azote assimilable du moût, les moûts plus riches aboutissant à des productions de sulfites plus importantes. La nature de l'azote assimilable n'est pas neutre en cela. Nous avons réalisé différents essais comparant un ajout d'azote ammoniacal à un ajout d'un nutriment organique spécifique (autolysat de levure fournissant des acides aminés, des vitamines et des minéraux): la nutrition organique a permis de produire nettement moins de SO₂ que la nutrition ammoniacale pour un même résultat en termes de sécurité fermentaire (figure 1). La nature de l'azote ammoniacal ajouté est évoquée pour avoir quelquefois une influence; le sulfate d'ammonium est à cet

■ Figure 1: Rôle de la nature du nutriment azoté en fermentation sur la production de SO₂ par la levure.

Diminution du SO₂ total post FA engendré par l'utilisation d'un nutriment organique par rapport à la nutrition minérale



(Levure IOC Révélation Thiols – Cépage Sauvignon blanc Nutriment organique : ProThiols)

égard une source de sulfate, précurseur du SO_2 (Cottereau et al., 2011). Au-delà de l'azote, la nutrition levurienne joue un rôle indirect sur les teneurs en SO_2 , en cela que la présence de thiamine biodisponible est susceptible de réduire la libération par la levure d'autres éléments combinant le SO_2 , à savoir, les acides cétoniques comme l'acide 2-oxaloglutarique ou l'acide pyruvique (Trioli et al., 2009). Néanmoins, il reste incontestable que la souche de levure exerce une influence considérable de par sa sensibilité et sa réactivité à ces différents paramètres sur la production fermentaire de SO_2 et d'éthanal.

Sélection phénotypique d'une levure œnologique à très faible production d'éthanal

L'éthanal, ou acétaldéhyde, est le composé œnologique ayant la plus forte constante d'affinité avec le SO_2 . Cela signifie qu'il est le principal responsable (à 75 % dans les vins blancs et 50 % dans les vins rouges) du détournement du SO_2 libre à activité œnologique vers sa forme combinée, inutile d'un point de vue technologique. Les levures fortement productrices de SO_2 libèrent généralement aussi, en réaction, de fortes teneurs en éthanal. En effet, ce composé permet, par combinaison au SO_2 libre, d'en limiter le pouvoir antifongique et donc de protéger la levure.

L'Institut français de la Vigne et du Vin a sélectionné, à partir de 489 souches isolées au vignoble et en cave, la levure IOCTwICE. À partir du 4° crible de sélection, les productions d'éthanal et de SO₂ des levures ont été prises en compte comme critères éliminatoires. À ce jour, IOCTwICE, levure sélectionnée pour l'élaboration de vins blancs présentant volume et fraîcheur gustative, aux arômes de fruits charnus et de citron, est également l'une des levures produisant le moins d'éthanal et des quantités réduites de SO₂ (figure 2). Son utilisation est recommandée par l'IFV pour la vinification de vins blancs à teneurs en sulfites limitées (Gerbaux et al., 2015).

Nouvelle technique de sélection de levures incapables de produire des quantités significatives de SO₂: les croisements assistés par marqueurs

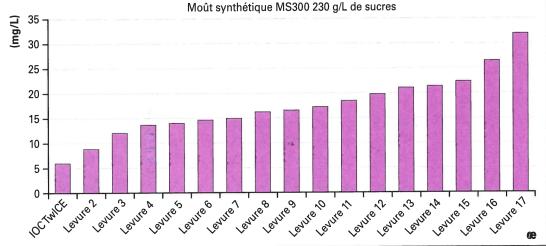
Récemment, l'INRA Sup Agro Montpellier a cartographié puis identifié à l'aide de marqueurs moléculaires deux gènes, MET2 et SKP2, impliqués dans la voie métabolique du soufre (Noble et al., 2015). SKP2 contrôle la réduction des sulfates en sulfites, tandis que MET2 pilote la conversion de l'homosérine en O-acetylhomosérine (OAH), laquelle peut réagir avec l'H₂S issu de la réduction du SO₂ pour former de l'homocystéine, un acide aminé soufré. Quelques rares levures combinent un allèle de MET2 ne conduisant qu'à une faible réduction des sulfates en sulfites et un allèle de SKP2 codant pour une forte production d'OAH, entraînant ainsi un détournement important du soufre indésirable (SO₂, H₂S) vers la production d'homocystéine. De telles levures sont ainsi incapables

de produire des quantités significatives de SO₂, d'H₂S mais également d'éthanal, la libération de ce dernier composé étant liée à celle des sulfites. L'identification d'une de ces levures a permis d'effectuer des rétrocroisements sur des souches d'intérêt œnologique, permettant ainsi la sélection de levures conservant l'essentiel du patrimoine sensoriel et technologique recherché mais intégrant l'incapacité à produire du SO₂ et de l'éthanal en quantités

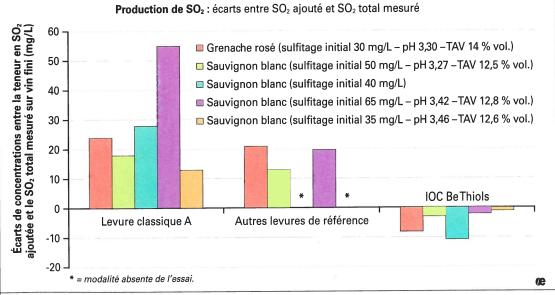
significatives et ce, quelles que soient les conditions de fermentation. La gamme de levures IOC Be a bénéficié d'une telle méthodologie de sélection. IOC BeThiols en est la première représentante et constitue ainsi le premier outil de révélation des thiols fruités (3MH et A3MH) des vins blancs ou rosés sans risque de production significative de SO₂ quel que soit l'environnement fermentaire (figure 3). Une levure adaptée à la production d'esters fruités d'acétate, IOC Be Fruits, est également désormais proposée.

Figure 2: rôle de la levure sur les teneurs finales en éthanal à l'issue de la fermentation alcoolique.

Concentrations finales en éthanal (mg/L) après fermentation alcoolique selon la levure



■ Figure 3: Limitation par la levure IOC BeThiols de la production de SO₂ pendant la fermentation alcoolique, comparativement à des levures classiques.



■ Tableau 1: Impact du pH et du moment d'inoculation en bactéries œnologiques sur les teneurs finales en éthanal et SO₂ combiné après fermentation malolactique (d'après Pan et al., 2011).

Valeur finale	Moment d'ensemencement en bactéries	pH 3,2	pH 3.35	pH 3.5	pH 3,65
Acétaldéhyde mg/L	Ensemencement post FA	29,6 ±0	30,4 ±0,5*	16,0 ±4	12,6 ±0
	Co-inoculation	19,0 ± 1	12,5 ±0,1*	15,4 ±0,1	7,3 ±0,4
SO₂ combiné mg/L	Ensemencement post FA	71,5 ± 15	84,5 ± 11	64,5 ±4	64 ± 2
	Co-inoculation	59,5 ±7	57 ±7	59 ±4	45 ±6

La maîtrise microbiologique en fermentation malolactique et en élevage

La fermentation malolactique, vecteur de la dégradation de l'éthanal

L'activité des bactéries lactiques, notamment Œnococcus œni, permet une transformation importante de l'éthanal en éthanol. Ce phénomène s'achève quelques jours (de 2 à 10 jours) après la fin de dégradation de l'acide malique, pour peu de n'avoir pas stabilisé le vin (et donc bloqué cette activité bactérienne). Une méthode plus sécuritaire pour dégrader l'éthanal, car n'obligeant pas à laisser un délai (durant lequel le vin est vulnérable) entre fin de dégradation de l'acide malique et stabilisation du vin, reste la co-inoculation, c'est-àdire, l'incorporation de bactéries cenologiques juste après le début de la fermentation alcoolique. Il a été montré (tableau 1) que la réalisation quasi-simultanée des deux fermentations conduit à des niveaux finaux d'éthanal, et donc de SO₂ combiné, significativement plus faibles que des réalisations plus tardives de la fermentation malolactique (FML) (Wei et al., 2011). La réalisation de la FML permet également la réduction des teneurs en acides cétoniques combinant le SO₂, selon la souche qui est à l'œuvre (Renouf, 2013).

La co-inoculation: un rempart contre les contaminants microbiens

En absence ou faible teneur en SO₂ actif, les risques de développement de levures contaminantes de type Brettanomyces est plus important. Il a été prouvé que la co-inoculation permettait de réprimer les développements précoces, en cours de FA, de Brettanomyces bruxellensis (figure 4) (Pillet et al., 2007). En pH élevé (> 3.5), les situations sont ainsi d'autant plus risquées: la proportion de SO₂ moléculaire est moindre et le développement bactérien facilité, laissant aussi le champ libre à des espèces des genres Lactobacillus et Pediococcus, autrement limités à des pH plus faibles. Ces bactéries peuvent être responsables d'altérations importantes de la qualité du vin. Dans ces situations de pH élevé, Œnococcus œni n'est d'ailleurs pas nécessairement l'espèce la plus compétitive.

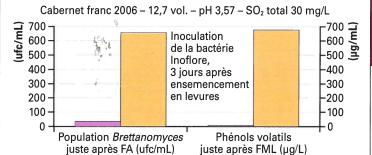
Un Lactobacillus plantarum, ML Prime™, sélectionné par Università Cattolica del Sacro Cuore à Piacenza et bénéficiant d'un nouveau procédé de production développé par la société Lallemand lui conférant une forte vitalité, présente des caractéristiques intéressantes pour la gestion de ces moûts et vendanges à pH élevé:

- une très forte activité malolactique, capable dans la plupart des cas de réaliser la FML en quelques jours;
- pas de risque de production d'acidité volatile en raison de son métabolisme hétérofermentaire facultatif (ne produit pas d'acide acétique à partir du glucose et du fructose).

Ce micro-organisme très compétitif à pH élévé (> 3.4) peut ainsi être utilisé en co-inoculation sans risque, de manière à occuper le milieu avant tout développement de bactéries d'altération et à permettre une stabilisation rapide du vin après FML.

■ Figure 4: Impact de la co-inoculation levures/bactéries sur le développement de *Brettanomyces bruxellensis* et la production de phénols volatils.

Prévention contre *Brettanomyces* grâce à la co-inoculation levures/bactéries



■ Co-inoculation (bactérie Inoflore) ■ Témoin non ensemencé

Limiter les contaminants en élevage

La vie microbiologique du vin ne cesse pas après réalisation de la FML, notamment en situations faiblement sulfitées. La FML a permis un appauvrissement du vin en éléments nutritifs, mais celui-ci reste encore vulnérable aux attaques microbiennes. Dans cette optique, des soutirages parfois alliés à des collages permettent une réduction au moins partielle de la charge microbienne, jugulant le danger sans le stopper complètement, une reprise de croissance étant toujours possible.

Un nouvel outil biotechnologique autorisé depuis peu en œnologie, représente une alternative intéressante pour protéger les vins des attaques microbiennes. En partenariat avec la société Kitozyme, une formulation de chitosane fongique, No Brett Inside, a ainsi été proposée pour éliminer les populations de *Brettanomyces bruxellensis* avec des résultats



avérés depuis maintenant plusieurs années (Blateyron-Pic et al., 2012; Pillet, 2014). Plus récemment, une seconde formulation de dérivés de chitine a été développée dans l'objectif spécifique de lutter contre les populations bactériennes, comme une alternative au SO2 tout autant qu'au lysozyme. Cette formulation, Bactiless™, a fait ses preuves notamment lors d'essais en conditions de vins rouges non sulfités (figure 5). Elle présente l'avantage de n'être d'origine ni de synthèse, ni animale, et de ne présenter aucune propriété allergène, n'entraînant donc aucune mention supplémentaire sur les étiquettes des bouteilles de vins. Elle pourrait être employée tant pour retarder voire bloquer la FML en vins blancs ou rosés que pour protéger les vins peu sulfités après FML.

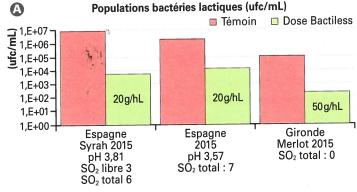
Conclusion

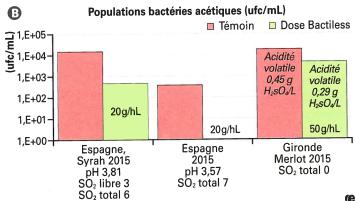
Bien que le sulfitage ne s'opère pas durant les opérations fermentaires, ces étapes représentent des moments clés de la vinification des vins à teneurs réduites en sulfites. L'utilisation de nouvelles générations de levures cenologiques permet à présent de s'affranchir des productions fermentaires de SO₂ et de composés combinant le SO₂, tout en respectant le profil sensoriel des vins. Par ailleurs, l'anticipation de la fermentation malolactique au moyen de nouveaux outils bactériens est un levier à considérer pour la production de vins à faibles teneurs en sulfites. Enfin des formulations innovantes issues de biopolymères sains et efficaces autorisent à présent des élevages plus sûrs en conditions de limitation de l'usage du SO₂.

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

■ Figure 5: Contrôle des populations bactériennes après fermentation malolactique grâce à une formulation de biopolymères fongiques en situations de vins à faibles teneurs en sulfites.





NDLR: La première partie de cet article a été publiée dans le numéro 160 (juillet 2016) et la troisième partie le sera dans le n° 161 Spécial (novembre 2016) de la Revue des Œnologues.

SPÉCIALE VITICULTURE

Éditions Groupe ICV



Franco France: 59 € TTC Franco tous pays: 77 €

Les cépages résistants aux maladies

Panorama européen

Ouvrage de vulgarisation destiné aux professionnels du monde viticole et aux passionnés, ce guide technique très complet vous apporte toutes les dernières informations sur la création variétale en Europe.

Un guide pratique pour:

- Connaître les cépages disponibles d'aujourd'hui et de de-
- Comprendre les avantages et les limites de l'utilisation de cépages résistants;
- S'informer sur les démarches à suivre pour mettre en œuvre des plantations expérimentales.

Avenir Œnologie

Livres de la collection Avenir Œnologie disponibles sur www.oeno.tm.fr Bulletin de commande en page 1 de la revue

Pour usage œnologique **EXCELLENCE®**



www.lamothe-abiet.com