

# Limitation des teneurs en sulfites par le contrôle de la flore microbienne et de son comportement avant et pendant fermentation alcoolique

Olivier Pillet

Institut œnologique de Champagne – Épernay – France.

## Introduction

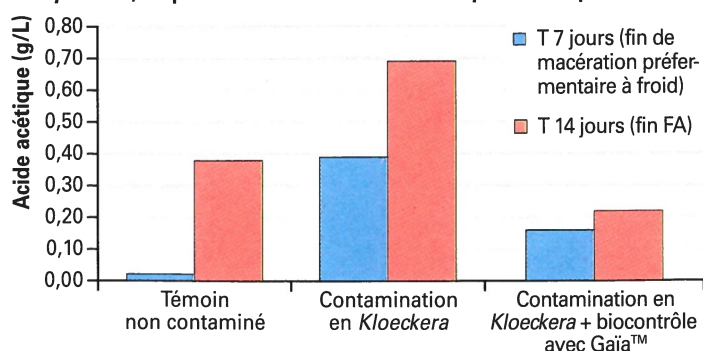
Le dioxyde de soufre est un auxiliaire technologique devenu d'utilisation évidente en œnologie tant ses bienfaits sont cruciaux. Sous sa forme moléculaire dite « active » ( $H_2SO_3$ ), il exerce un rôle antiseptique de stabilisation microbiologique du vin à travers ses activités bactéricides et fongicides (Devèze, 1977). Sous sa forme libre (moléculaire mais aussi salifiée  $HSO_3^-$ ), il montre également un pouvoir antioxydant (Ribereau-Gayon, 1933; Dubernet, 1973; Vivas, 1999) – en réagissant indirectement avec l'oxygène dissous pour s'oxyder en sulfates –, mais aussi antioxydasique (Kovac, 1979) en inhibant les enzymes provoquant des oxydations (inhibition totale pour la tyrosinase originaire du raisin, partielle sur la laccase produite par *Botrytis cinerea*). Enfin par combinaison avec l'éthanal, il en neutralise l'odeur d'évent.

Le  $SO_2$  est cependant pointé du doigt depuis quelques années en raison de ses nombreux inconvénients :

- il est toxique pour l'organisme humain et présente un danger à ce titre, à la fois pour le consommateur de vin, mais également pour le manipulateur en cave ;
- il est un précurseur possible d'arômes soufrés négatifs dits « de réduction », produits lors des fermentations (Henschke et Jiranek, 1991); ou encore, peut 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 (Cléroux et al., 2015);
- son odeur est perceptible et/ou peut masquer certains arômes positifs du vin (Peynaud et Blouin, 1991);

■ **Figure 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  $SO_2$  – MP 7 jours à 15 °C puis inoculation avec *Saccharomyces cerevisiae* – FA à 20/24 °C.**

**Formation d'acide acétique suite à une contamination par *Kloeckera apiculata*, en présence ou absence d'une bioprotection par Gaïa™**



– en se combinant aux anthocyanes, pigments des vins rouges et rosés, il provoque leur décoloration partielle, certes réversible.

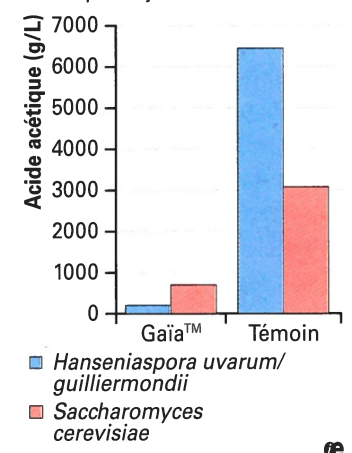
Pour ces raisons, de nombreuses recherches visent à réduire son utilisation en œnologie et à lui trouver des alternatives tant sur ses capacités antimicrobiennes que sur ses qualités antioxydantes. Dans cette synthèse, nous nous attacherons à évaluer quelques outils biotechnologiques alternatifs issus d'une approche essentiellement microbiologique.

## Phases préfermentaires : maîtrise des contaminants microbiens par le biocontrôle

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 : 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). L'un des principaux coupables identifiés est *Kloeckera apiculata* (aussi appelée *Hanseniaspora uvarum*), responsable de fortes montées potentielles d'acidité volatile et d'acétate d'éthyle (Lonvaud-Funel et al., 2010; Blondin, 2011) et à forte capacité de croissance en conditions préfermentaires. Les stratégies mettant en œuvre un levurage précoce avec des

■ **Figure 2 : Développement de flores indigènes potentiellement contaminantes en sortie de MPF, avec ou sans biocontrôle avec Gaïa™ dès l'encuvage.**

**Impact de Gaïa™ sur le développement de levures d'altération en macération préfermentaire (Merlot – pH 3,84 – Sucres 275 g/L – Dénombrements après 4 jours à 10-15 °C)**



flores fermentaires sélectionnées (*Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*) ont montré une certaine efficacité pour maîtriser les populations de contaminants microbiens.

Cependant, leur addition durant les phases préfermentaires reste susceptible de déclencher prématurément la FA, par exemple, sur bourbes pour les blancs ou les rosés, ou avant la fin de la durée souhaitée de macération préfermentaire dans le cas des vinifications en rouge. Ce risque est d'autant plus élevé que le sulfitage est faible ou absent et que les températures sont tièdes (> 10 °C) plus que froides (< 8 °C). Pour cette raison, IFV Beaune a sélectionné une levure

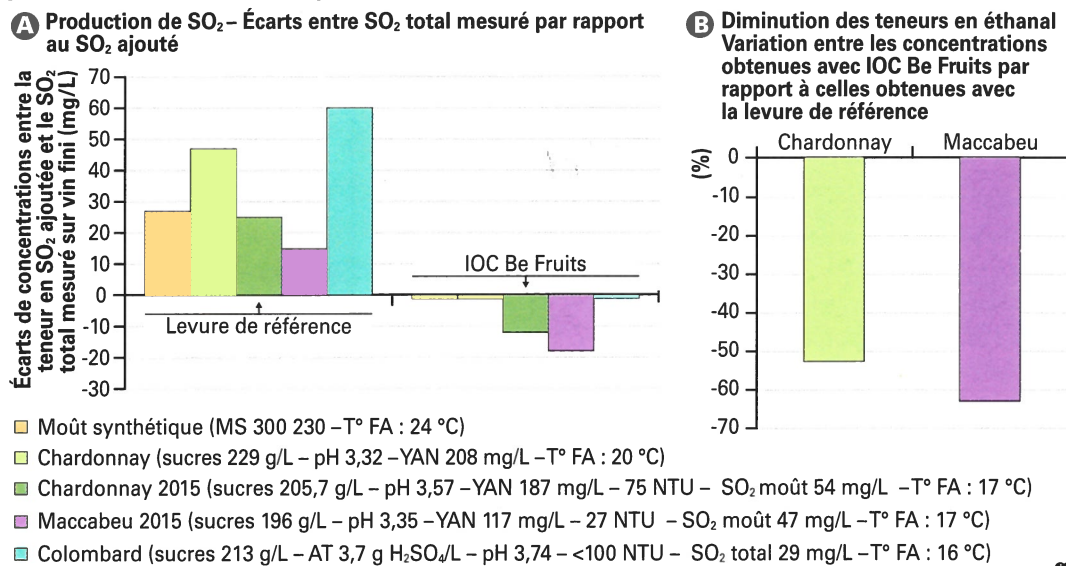
*Metschnikowia fructicola* sans pouvoir fermentaire, Gaïa™, afin d'offrir un biocontrôle massif, avec un fort niveau de population (dosage de 7 à 20 g/hL : de 3 à 9 millions de cellules/mL), tout en limitant le risque de départ prématuré en FA. Son efficacité a été validée sur différentes expérimentations comparatives dans le cadre de deux applications en vinification en rouge :

– l'ajout à l'encuvage pour réprimer *Kloeckera* en macération préfermentaire à froid sans déclencher la FA : la compétition exercée par Gaïa™ a permis d'éviter le développement incontrôlé de *Kloeckera* et ainsi la production démesurée d'acidité volatile (**figure 1**).

– l'ajout plus précoce, sur la vendange fraîche, pour protéger celle-ci en absence ou en réduction de sulfites, avant et durant son transport vers le chai et jusqu'à son levurage en *Saccharomyces cerevisiae*.

Des ajouts de Gaïa™ en sortie de pressoir des moûts blancs, à des températures inférieures à 10 °C, ont également été validés, sans déclenchement de FA sur bourbes. Au-delà de la répression exercée sur *Kloeckera/Hanseniaspora*, on peut observer que la levure Gaïa™ permet aussi de réprimer un développement trop important de levure indigène *Saccharomyces* potentiellement contaminante (**figure 2**). Cela se traduit par une meilleure implantation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sélectionnée et, durant la FA, un rapport de populations en faveur de cette dernière. De cette manière, bien que *Metschnikowia fructicola* ne déclenche pas la FA, elle permet indirectement de la sécuriser en limitant la compétition s'exerçant contre la levure de fermentation sélectionnée. Des caractérisations supplémentaires ont par ailleurs montré la très faible consommation d'azote par Gaïa™ (de l'ordre de 10 à 20 mg/L d'azote assimilable), son absence de production de SO<sub>2</sub> ou d'autres métabolites indésirables.

■ **Figure 3: Incapacité à produire des quantités significatives de sulfites et importantes d'éthanal par une levure sélectionnée par croisements assistés (IOC Be Fruits).**



### La maîtrise de la fermentation alcoolique : lutter contre la production de SO<sub>2</sub> et de combinants

Les levures cœnologiques sont susceptibles de produire des quantités significatives de SO<sub>2</sub> 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 (type et quantité d'azote assimilable, température de fermentation, turbidité du moût, niveau de sulfitage initial du moût) et la souche de levure, ce dernier facteur étant le principal. Récemment les voies génétiques et métaboliques, responsables de ces différences entre levures, ont été explicitées (Noble *et al.*, 2015). Quelques rares levures sont ainsi incapables de produire des quantités significatives de SO<sub>2</sub>, d'H<sub>2</sub>S mais également d'éthanal, principal combinant du SO<sub>2</sub>, la libération de ce dernier composé étant généralement liée à celle des sulfites. L'identification d'une de ces levures a permis d'effectuer des rétrocroisements sur des souches d'intérêt cœnologique, permettant ainsi la sélection de levures conservant l'essentiel du patrimoine sensoriel et technologique recherché mais intégrant l'incapacité à produire du SO<sub>2</sub> et de l'éthanal en quantités significatives et ce, quelles

que soient les conditions de fermentation. À ce titre, les deux levures IOC BeThiols (dédiée à la révélation des arômes de type thiols variétaux dans les vins blancs ou rosés) et IOC Be Fruits (adaptée à la production d'esters d'acétate contribuant aux arômes de fruits frais) ont été validées, tant au niveau sensoriel qu'analytique, pour l'obtention de vins expressifs à faibles teneurs en sulfites et éthanal (**figure 3**).

### La maîtrise de la fermentation alcoolique : anticiper la protection oxydative du vin

Parmi les composés préservant le vin contre l'action oxydative, le glutathion, tripeptide naturellement présent dans le raisin dans des teneurs variables, est l'un des outils alternatifs au SO<sub>2</sub> le plus intéressant. Il agit notamment en réduisant les quinones, produits de l'oxydation des acides phénols, avant que celles-ci puissent oxyder à leur tour les arômes variétaux de type thiols ou encore polymériser et ainsi, causer un brunissement oxydatif.

Bien que l'ajout de glutathion pur ne soit pas autorisé dans les produits alimentaires, l'utilisation de levures inactivées est parfaitement admise. Certaines de ces levures inactivées sont particulièrement riches en glutathion et ainsi susceptibles de contribuer naturellement à optimiser les teneurs du vin en ce peptide. Des travaux récents ont montré que le meilleur moment d'ajout de telles alternatives aux lies, pour aboutir à une teneur élevée en glutathion dans les vins correspondants, se situerait en tout début de FA ou au plus tard au tiers de la FA (Kritzinger *et al.*, 2012). Nous avons réalisé, dans le cadre de vinifications à faibles additions de sulfites, un essai comparatif pour évaluer l'intérêt d'une levure inactivée particulièrement riche en glutathion réduit (la seule forme de glutathion réellement active au regard de l'oxydation), Glutarom Extra. Cette levure inactivée a été ajoutée juste après levurage du moût à la dose de 20 g/hL, et ce sur deux matières premières différentes (Sauvignon – Sud-Ouest de la France ; Chardonnay – Languedoc) avec toujours un témoin sans ajout en comparaison. Les moûts n'ont pas été sulfités, les vins l'ont été faiblement (4 mg/L sur Sauvignon, 15 mg/L sur Chardonnay). Les résultats permettent de valider l'obtention de teneurs plus élevées en glutathion réduit sur les modalités avec addition de la levure inactivée spécifique, mais également une meilleure tenue à l'air du vin obtenu (**figure 4**), confortant le pouvoir antioxydant du glutathion réduit. Si cet outil ne permet pas de se passer complètement de SO<sub>2</sub>, il contribue cependant à en limiter la dose d'utilisation.



### Utiliser la fermentation alcoolique pour la fermentation malolactique: l'intérêt de la co-inoculation

L'activité des bactéries lactiques, notamment *Enococcus oeni*, permet une dégradation importante de l'éthanal. Ce phénomène s'achève quelques jours (de 2 à 10 jours) après la fin de dégradation de l'acide malique, à condition 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-à-dire, l'incorporation de bactéries œnologiques juste après le début de la FA. Il a été montré que la réalisation quasi-simultanée des deux fermentations conduit à des niveaux finaux d'éthanal, et donc de SO<sub>2</sub> combiné, significativement plus faibles que des réalisations plus tardives de la fermentation malolactique (FML) (Wei et al., 2011).

Il a été également prouvé que la co-inoculation avec *Enococcus oeni* permettait de réprimer les développements précoces, en cours de FA, de *Brettanomyces bruxellensis* (Pillet et al., 2007).

En situation de pH élevé (> 3,5), le risque est d'autant plus grand : la proportion de SO<sub>2</sub> moléculaire est moindre, laissant aussi le champ libre à des espèces bactériennes 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, *Enococcus oeni* n'est d'ailleurs pas nécessairement l'espèce la plus compétitive. C'est pourquoi un *Lactobacillus plantarum*, ML Prime™, sélectionné par Università Cattolica del Sacro Cuore à Piacenza et faisant preuve d'une forte vitalité, a été développé. Homofermentaire pour le glucose et le fructose, il ne peut ainsi pas produire d'acide acétique à partir des sucres présents dans le moût en fermentation. Il se présente ainsi comme un outil simple et sécuritaire pour la gestion de la co-inoculation sur moût/vendange rouge de maturité élevée (pH du moût > 3,4, acide malique initial < 3 g/L).

Des expérimentations comparatives en conditions réelles ont été réalisées, validant l'obtention de vins à plus faible teneur en acidité volatile grâce à ce *Lactobacillus plantarum* (figure 5).

### Conclusion

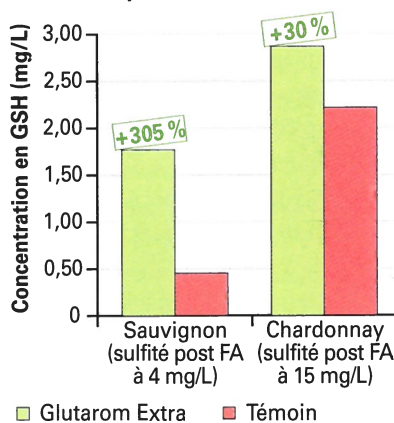
Sans prétendre à l'exhaustivité, les travaux exposés dans cet article permettent d'envisager des alternatives partielles à l'utilisation des sulfites en vinification, tout autant qu'à permettre l'obtention de vins à plus faibles teneurs en SO<sub>2</sub> total. En phases préfermentaires, en l'absence de risque oxydatif, l'utilisation d'une flore levurienne sélectionnée sans pouvoir fermentaire, Gaïa™, permet de se passer complètement de SO<sub>2</sub> à ce stade-là ou bien de compléter son efficacité en maintenant un équilibre microbien propice à la qualité du vin.

L'utilisation d'une nouvelle génération de levures fermentaires réduit les risques de production de sulfites et d'éthanal pendant la fermentation, limitant directement les teneurs en SO<sub>2</sub> des vins finis tout autant qu'augmentant l'efficacité du SO<sub>2</sub> ajouté.

Au regard du risque oxydatif, l'utilisation en début de FA d'une nouvelle levure inactivée riche en glutathion réduit a permis d'améliorer significativement la tenue à l'air d'un vin faiblement sulfité. Elle peut agir par anticipation en complément d'une autre levure inactivée, développée pour protéger les vins durant l'élevage et déjà décrite par ailleurs pour sa capacité à consommer l'oxygène dissous (Sieczkowski et al., 2016). Enfin, l'utilisation raisonnée de la co-inoculation levures/bactéries, au moyen de flores sélectionnées innovantes, est un levier supplémentaire de maîtrise des composés combinants ainsi que de limitation des risques d'altération microbienne.

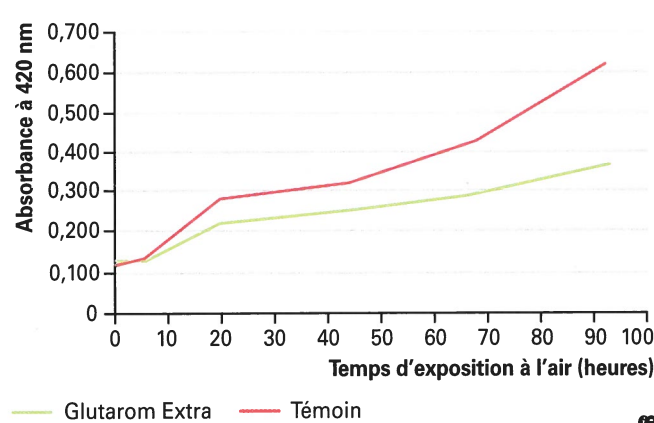
■ **Figure 4: Intérêt d'une levure inactivée spécifique ajoutée en début de fermentation pour augmenter le potentiel antioxydant des vins.**

**A** Impact d'un ajout de Glutarom Extra en début de fermentation alcoolique sur les teneurs en glutathion réduit des vins peu sulfités



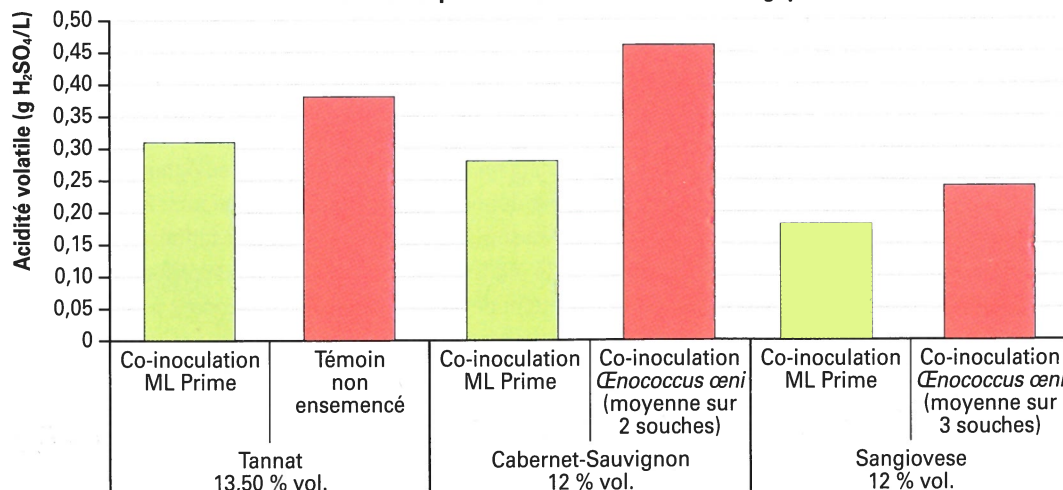
**B** Dynamique de tenue à l'air en conditions de faible sulfitage

Absorbances à 420 nm - Chardonnay 2014  
Mesure pour post FA après sulfitage  
Sulfitages sur moût : 0 g/hL - Vin post FA + avant mise : 40 mg/L



■ **Figure 5: Limitation des augmentations d'acidité volatile pendant la FML grâce à la co-inoculation avec la bactérie *Lactobacillus plantarum* ML Prime (résultats Cabernet-Sauvignon et Sangiovese: source Lallemand).**

Acidité volatile post FML selon la bactérie œnologique utilisée



**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](http://www.oeno.tm.fr)