

Biosanitation de l'équipement de récolte et de réception vendange à l'aide d'une souche de levure *Metschnikowia fructicola*

Arnaud Regli, Olivier Pillet

Institut œnologique de Champagne – Épernay – France.

Contexte de l'étude

La réduction des doses de sulfites dans les vins incite à chercher des alternatives adaptées pour limiter les risques de contamination en cave. La limitation de ces risques passe notamment par la maîtrise de l'hygiène du matériel (machine à vendanger, conquet de réception, table de tri, cuves...) tout au long de la période de vendanges. Les odeurs acétiques, symptomatiques des montées d'acidité volatile et observées occasionnellement pendant les phases pré-fermentaires, sont généralement causées par des micro-organismes indésirables tels qu'*Hanseniaspora uvarum* ou *Pichia kluyveri* (Maturano et al., 2015; Gerbaux et al., 2016). Les sulfites sont souvent la solution privilégiée, parfois insuffisante, pour lutter contre ces contaminations précoces.

Mais le souhait de l'industrie vinicole de diminuer les teneurs en SO₂, pour des raisons de santé publique (allergies) ou pour répondre aux exigences de certains cahiers des charges (agriculture biologique, Demeter), conduit à évaluer de nouvelles solutions alternatives.

La bioprotection a récemment fait ses preuves en tant que complément ou substitut aux sulfites pour une gestion microbiologique naturelle, en introduisant dans la masse une espèce sélectionnée afin de contrôler l'environnement préfermentaire (Pillet et al., 2019; Simonin et al., 2019; Morata et al., 2021; Bastien, et al., 2021).

La précocité des contaminations nous amène à envisager son application sous la forme d'une « biosanitation » du matériel de récolte ou de réception, visant à limiter au plus tôt la contamination du matériel lui-même au fur et à mesure d'une journée de récolte.

Matériel et méthodes

Afin de mesurer l'impact de la biosanitation, deux études ont été réalisées. L'objectif dans les deux cas a été d'une part d'identifier le risque de développement précoce des micro-organismes potentiellement d'altération en absence de biosanitation, à la fois sur les surfaces du matériel et sur les jus ou vendanges qui en sont issus, et d'autre part d'évaluer l'efficacité d'une biosanitation pour limiter ces risques.

Chaque essai compte donc deux modalités séquentielles : un témoin sans biosanitation du matériel, suivi d'une modalité biosanitée.

Mise en œuvre

La première étude, réalisée lors des vendanges 2021, a été réalisée à l'échelle de la machine à vendanger. Pour ce faire, une machine à vendanger New Holland NH 9040 a été utilisée pour la récolte des raisins de cépage merlot, avec une benne portative utilisée pour le transport de la vendange vers le chai de vinification. La seconde étude, en 2022, s'est intéressée à l'application sur une chaîne de tri. Pour ce faire, deux tables de tri composées chacune

d'un tapis élévateur et d'un tapis mécanique vibrant ont été utilisées pour l'acheminement des raisins de cépage petit verdot, vers un cuvon de transfert de vendange permettant un encuvage de raisins par gravité. La levure de bioprotection *Metschnikowia fructicola* souche IOC Gaïa™ a servi à la biosanitation. Sélectionnée en partenariat avec l'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) de Beaune, elle a été choisie pour sa capacité à limiter la multiplication de levures d'altération indésirables (*Hanseniaspora uvarum*) et de bactéries acétiques à fort potentiel d'implantation sur moûts.

La levure *M. fructicola* a été réhydratée à 20 °C à raison de 50 grammes de levures par litre d'eau. À l'aide d'un pulvérisateur manuel, la suspension de levure a été répandue de manière homogène sur les surfaces à biosaniter :

– dans le premier essai : sur les convoyeurs de raisin, les batteurs et la benne portative de la machine à vendanger en marche, après chaque bascule/vidage des bennes. La moitié du contenu a été pulvérisée (pour un équivalent de 5 grammes de levure par hl de vendange) et le restant a été ajouté en cuves de 150 hl lors de l'encuvage. La dose de levures cumulée par ces différents ajouts est de 10 g/hl ;

– dans le second essai : l'ensemble du matériel de tri ainsi que le cuvon de réception ont été biosanités avant le passage des raisins. Le contenu du pulvérisateur a été utilisé sur un volume de vendange de 140 hl, ce qui représente une dose ajoutée de 9 g/hl.

Suivi analytique

Des écouillons stériles de référence « Flocked Swab » de VWR ont été utilisés pour les prélèvements microbiologiques de surface, tandis que des récipients stériles ont servi à recueillir les jus en vue de contrôles microbiologiques. Ces prélèvements ont été effectués de la manière suivante sur chaque modalité.

Lors de l'essai sur machine à vendanger :

– sur la surface interne de la benne portative de la machine à vendanger (en prenant soin de couvrir une zone représentative du contact de la machine avec la vendange) en striant un carré de surface précis avec l'écouvillon. Les prélèvements ont été réalisés avant remplissage puis après vidage ;

– dans les jus d'écoulement en sortie de la benne portative de la machine : à mi-ramassage et en fin de ramassage ;

– dans le moût en fin de macération préfermentaire.

Lors de l'essai sur table de tri :

– sur les surfaces de la table de tri vibrante avant et après passage de la récolte sur chaque modalité ;

– dans les jus d'écoulement du cuvon de réception en milieu et fin de ramassage.

– dans le moût en fin de macération préfermentaire. Ces échantillons

ont été analysés par le laboratoire Microflora (Villenave d'Ornon, Gironde, France). Le milieu de culture spécifique WL permettant l'identification de levures a été utilisé. Les échantillons sont incubés dans des conditions contrôlées. L'identification au niveau de l'espèce de dix clones de levures est ensuite effectuée au moyen de la technique MALDI-TOF/MS.

Les paramètres œnologiques classiques ont été analysés par le laboratoire EVV de Port Sainte Foy (Gironde, France) pour l'essai 1, et le laboratoire Cœnocentre de Pauillac (Gironde, France) pour l'essai 2. Ces analyses ont été effectuées après l'encuvage, après la macération pré-fermentaire et en fin de fermentation alcoolique pour chaque modalité d'essai.

Constitution des modalités

Le choix a été fait de récolter un rang sur deux d'une parcelle pour constituer la première modalité (témoin), puis de ramasser les rangs restants pour constituer la seconde modalité (biosanitée), afin d'avoir deux modalités homogènes.

Dans le premier essai, chaque cuve a été sulfitée à 5 g/hl à l'encuvage. La macération pré-fermentaire (MPF) a été menée sur les deux cuves de 150 hl pendant deux jours et demi à 8 °C. Aucune intervention manuelle n'a été effectuée jusqu'au lancement de la fermentation alcoolique (FA). Dans le second essai, chaque cuve a été sulfitée à 3 g/hl à l'encuvage. La MPF a été menée sur les deux cuves de 140 hl pendant un jour à 10 °C.

Les températures de MPF et de FA ont été enregistrées avec précision. La fermentation alcoolique a été déclenchée par inoculation d'une levure *S. cerevisiae* préalablement réhydratée. Les vins ont été conservés de manière isolée jusqu'en fin de FA afin d'effectuer un dernier contrôle analytique et une dégustation des vins.

Résultats et discussion

Évaluation du risque microbiologique et de l'hétérogénéité de contamination sur le matériel vinaire

Avant biosanitation, sur la modalité qui sera ensuite biosanitée, la machine à vendanger présente des niveaux plus importants en levures d'altération (essentiellement *Hanseniaspora uvarum* et dans une moindre mesure *Pichia*), par rapport à la modalité qui restera non traitée (tableau 1). C'est également la tendance lors de l'essai sur table de tri. Ces résultats nous apportent deux conclusions :

- un risque microbiologique de contamination réel est présent sur les surfaces de l'équipement, justifiant l'expérimentation de biosanitation ;
- il existe une forte hétérogénéité de contamination entre les deux modalités, probablement due au décalage temporel entre leur mise en œuvre.

Ceci va nous conduire à estimer avant tout les évolutions de ces contaminations davantage que les valeurs absolues, lorsqu'on cherchera à comparer les résultats de biosanitation vis-à-vis des témoins non biosanités.

Impact de la biosanitation sur la maîtrise du risque microbiologique

Répartitions des flores microbiennes sur les surfaces du matériel en cours de ramassage

Sur la machine à vendanger biosanitée, après récolte, la population d'*H. uvarum*, bien que plus élevée qu'au départ, est concurrencée par *M. fructicola* (qui domine à 90 % la flore de surface). Sur la modalité témoin les levures d'altération restent au contraire entièrement dominantes (figure 1A). Sur la surface de la table de tri (figure 1B), ces observations se retrouvent. En fin de tri, la modalité biosanitation affiche une dominance exclusive de *M. fructicola*, tandis que le témoin présente un niveau en levures d'altération toujours dominant (figure 1B). Outre le fait d'avoir pu s'implanter aisément sur les surfaces, la population de levure *M. fructicola* augmente en cours de tri sur la modalité biosanitée. Ainsi, même en présence d'une charge microbienne élevée, la biosanitation se traduit par l'implantation et l'adhésion de la population inoculée de *M. fructicola* sur les surfaces des matériels. Nous n'avons pas observé de perte de populations liée au passage répété des raisins, au contraire.

Évolution de la répartition des flores microbiennes dans les jus au cours de la récolte et du tri

Dans la première expérimentation sur machine à vendanger, l'étude des jus provenant de l'écoulement de la benne portative a permis d'identifier sur la modalité témoin (sans biosanitation) un niveau

élevé en levures d'altération au milieu de la récolte ($1,0 \cdot 10^4$ CFU/ml), atteignant un pic important en fin de ramassage ($1,2 \cdot 10^6$ CFU/ml), soit 25 fois la population initiale des jus à mi-récolte (figure 2A). La levure prédominante à la fin du ramassage est exclusivement *H. uvarum*. Dans la modalité biosanitée, une compétition est visible dans les jus en milieu et en fin de ramassage grâce à *M. fructicola* ($3,5 \cdot 10^4$ CFU/ml) qui semble restreindre la croissance des levures d'altération ($1,5 \cdot 10^4$ CFU/ml). L'effet de la biosanitation est également mis en évidence lors de l'application sur chaîne de tri (figure 2B). En effet, les jus issus du cuvon de transport des raisins présentent pour le témoin une concentration encore 24 % plus élevée en levures indésirables, principalement constituées d'*H. uvarum* (70 %). La modalité biosanitée en revanche ne laisse apparaître que *M. fructicola*, fortement ($1,4 \cdot 10^5$ CFU/ml) et rapidement implantée dans les jus. Nous constatons donc également dans les jus une excellente implantation de *M. fructicola*, malgré une présence initiale importante de levures indésirables. La pulvérisation de la suspension de levures *M. fructicola* sur les surfaces des deux types d'équipement (machine à vendanger et table de tri) en contact avec les raisins permet bien une maîtrise de la flore et la multiplication rapide de cette levure dans les jus.

État des lieux de la répartition microbiologique en fin de macération préfermentaire

La biosanitation permet de maîtriser efficacement la prolifération des levures d'altération. Sur la première application, on observe une chute importante des niveaux de levures indésirables (figure 3A). La deuxième application confirme ce succès, ne montrant aucune évolution en fin de macération préfermentaire (figure 3B).

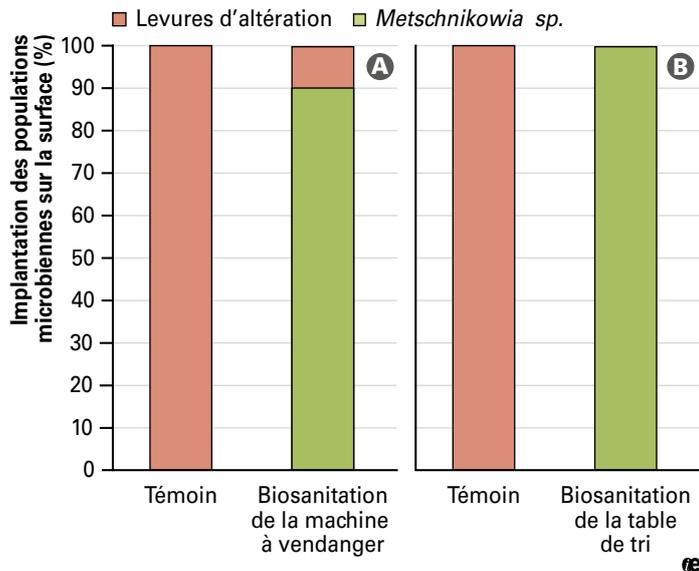
Au contraire, sans biosanitation, les niveaux en levures d'altération continuent d'augmenter (de 4 à 15 fois le niveau initial).

■ **Tableau 1 : État des lieux des niveaux de population de levures d'altération sur les surfaces au début des phases de ramassage ou de tri, avant biosanitation.**

Essai	Équipement inspecté	Moment du prélèvement	Modalité	Levures d'altération UFC/ml
Essai 1	Machine à vendanger (surface des godets embarqués)	Avant récolte et avant toute biosanitation	Future modalité témoin	2,00E+04
			Future modalité biosanitation	1,40E+06
Essai 2	Table de tri (surface)	Avant tri et avant toute biosanitation	Future modalité témoin	5,00E+05
			Future modalité biosanitation	3,50E+07

■ **Figure 1 : Répartitions des flores microbiennes sur les surfaces du matériel en cours de ramassage.**

- Ⓐ Répartition des populations estimées sur les surfaces de la machine à vendanger - stade fin de ramassage.
- Ⓑ Répartition des populations estimées sur les surfaces de la table de tri - stade fin de tri.



Cette évolution microbiologique est très marquée lors de l'essai sur table de tri. Outre un développement de *S. cerevisiae* indigènes ($9,6.10^4$ CFU/ml) en fin de macération préfermentaire, susceptible de mettre en péril l'implantation ultérieure d'une levure sélectionnée, la concentration en levures non-*Saccharomyces* indésirables atteinte est sept fois supérieure à celle relevée en milieu de tri.

Ainsi, la biosanitation permet de maîtriser le niveau en levures d'altération jusqu'en fin de MPF, tandis que le sulfitage du lot témoin n'entrave pas totalement leur population initiale et sa croissance ni les risques de départ en FA spontanée.

Implications pratiques et perspectives

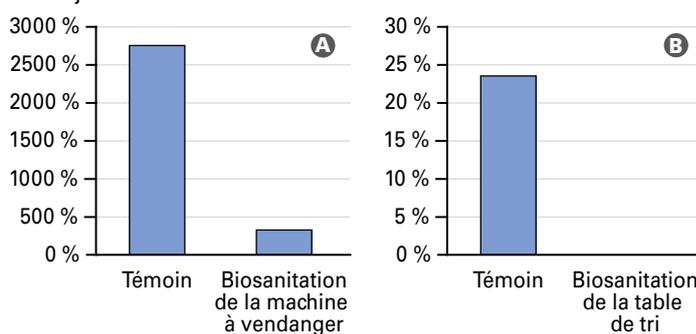
En conclusion, malgré une charge microbiologique initiale

particulièrement défavorable à l'approche de la biosanitation, nos recherches confirment plusieurs observations :

- les populations en *S. cerevisiae* sont généralement minoritaires sur raisins et lors des étapes de récolte et réception : on observe au contraire un risque élevé lié à la présence d'espèces indésirables ;
- nous avons constaté une excellente implantation de la souche de levure *M. fructicola* utilisée dans cette étude en surface du matériel, en cours et après passage de la récolte : cette indication valide une adhésion de cette souche malgré des phénomènes possibles de lessivage par passages continus de la vendange ;
- l'implantation de cette souche dans les jus a conduit à une maîtrise notable de la charge en levures indésirables au fil du temps, notamment *H. uvarum*, susceptible de produire de l'acide

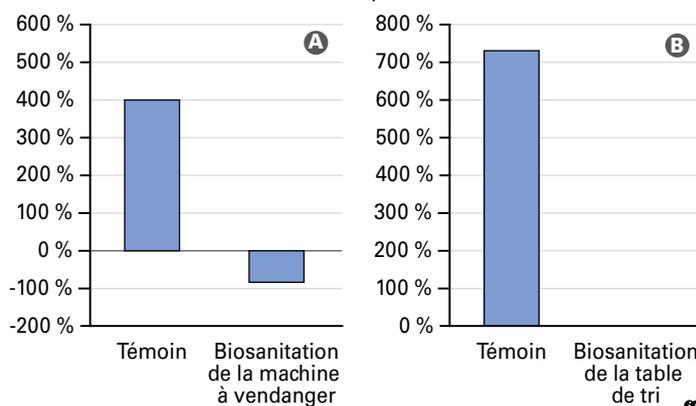
■ **Figure 2 : Évolution de la répartition des flores microbiennes dans les jus au cours de la récolte et du tri.**

- Ⓐ Évolution des populations estimées de levures d'altération dans les jus entre le milieu et la fin du ramassage avec la machine à vendanger.
- Ⓑ Évolution des populations estimées de levures d'altération dans les jus entre le milieu et la fin du tri.



■ **Figure 3 : État des lieux de la répartition microbiologique en fin de macération préfermentaire.**

- Ⓐ Évolution des populations estimées de levures d'altération entre la fin du ramassage et la fin de macération pré-fermentaire.
- Ⓑ Évolution des populations estimées de levures d'altération entre la fin du tri et la fin de macération pré-fermentaire.



acétique et de l'acétate d'éthyle ;

– bien que moins significative, une limitation du développement en bactéries acétiques a également été observée dans le cadre de ces deux études (résultats non présentés).

Ces résultats ouvrent des perspectives prometteuses quant à l'application pratique de cette méthode avec la souche de bioprotection, IOC Gaïa™, validée dans ces travaux. Au-delà des cas exposés dans ces lignes, on peut imaginer l'intérêt de la biosanitation avec cette *M. fructicola* appliquée à d'autres équipements vinaires : conquets, bains densimétriques, fonds de bennes à vendanger ou encore conduits de transport de la vendange.

NDLR: Les références bibliographiques concernant cet article sont disponibles sur le site internet de la Revue des Œnologues : search.oeno.tm.fr