

Interactions et équilibres entre les micro-organismes durant les phases pré-fermentaire et fermentaire

■ Madame Marie-Laure MURAT

Laboratoire SARCO, BP 40, 33072 Bordeaux, France.

marielaure.murat@sarco.fr

■ Monsieur Vincent RENOUF

Laffort, BP 17, 33072 Bordeaux, France.

vincent.renouf@laffort.com

Introduction

Durant les vinifications, vous n'êtes pas les seuls acteurs ! En effet, vous cohabitez avec de très nombreux micro-organismes parmi lesquels levures et bactéries jouent un rôle clef. Certaines souches et/ou espèces présentent un intérêt œnologique tandis que d'autres peuvent engendrer de profondes et irréversibles altérations.

Les travaux de Vincent Renouf (6) ont clairement démontré que la plupart des micro-organismes rencontrés en œnologie sont présents au vignoble. On trouve des espèces fermentaires telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Cenococcus oeni*; des bactéries acétiques mais également des germes d'altération tels que *Brettanomyces* (7), *Zygosaccharomyces* ou bien *Pediococcus*.

Cette microflore œnologique est très diversifiée. Elle représente seulement une minorité de la microflore du raisin. Les espèces majoritaires étant inconnues en œnologie (elles créent un biofilm à la surface des baies qui assure la cohésion de l'ensemble de l'écosystème microbien) (4, 5).

Cette microflore est également très dynamique : la transformation du jus de raisin en vin résulte de l'activité de divers micro-organismes. Après foulage, certains micro-organismes indigènes trouvent dans le moût des conditions favorables à leur croissance. L'ensemble des populations microbiennes commence alors à se multiplier.

Puis les levures *Saccharomyces* se développent plus rapidement que les levures non-*Saccharomyces*, les bactéries acétiques et lactiques dont les populations chutent rapidement.

A ce stade, la dégradation des sucres débute : c'est la fermentation alcoolique (FA) dont *S. cerevisiae* est l'actrice principale.

Durant la FA, les bactéries acétiques disparaissent complètement du milieu. Les levures non-*Saccharomyces* ainsi que les bactéries lactiques résistent et atteignent un plateau autour de 10² UFC/mL. Au terme de la FA, les populations de *Saccharomyces* déclinent et les non-*Saccharomyces* ainsi que les bactéries lactiques commencent à se multiplier. Les bactéries possèdent un avantage dans la mesure où leur substrat préféré, l'acide L-malique, est présent en grande quantité. Cette situation encourage leur développement et la dégradation de l'acide L-malique débute : c'est la fermentation malolactique (FML).

Ainsi du raisin au vin, à chaque stade, les conditions du milieu changent : production d'éthanol, absence d'oxygène, présence de SO₂, variation de température...

Ceci conduit à la sélection des micro-organismes les plus résistants : parmi les levures, *Brettanomyces bruxellensis* est mieux armée que les autres espèces face à ces nouvelles conditions du milieu. Parmi les bactéries, l'espèce la plus résistante est sans aucun doute *Cenococcus oeni*. *Pediococcus sp.* peut également apparaître dans certains cas mais généralement en fin d'élevage (2).

Tous ces micro-organismes interagissent également à chaque stade du processus de vinification : avec la matière première, avec les

techniques de vinification et entre eux. Dans cet exposé, nous nous attacherons à étudier les interactions entre *Brettanomyces* et les autres micro-organismes. En effet, les altérations dues à ces levures sont toujours un problème d'actualité dans l'industrie du vin.

Rappelons les principales caractéristiques de ce redoutable micro-organisme. Les levures *Brettanomyces* sont particulièrement résistantes. Elles sont hautement tolérantes à l'éthanol et au SO₂ (plus que les levures *S. cerevisiae* et les non-*Saccharomyces*). Capables de survivre dans un milieu pauvre en sucres, elles ont des besoins nutritifs plus faibles que *S. cerevisiae*. Elles se développent bien avec ou sans oxygène. Pour toutes ces raisons, en cas d'instabilité et / ou de difficultés des autres espèces, *Brettanomyces* peut facilement se multiplier (7, 8).

Ainsi, en l'absence d'une parfaite maîtrise des interactions microbiennes, il existe un grand risque d'altération.

En ce sens, certaines étapes clefs de la vinification doivent être parfaitement maîtrisées :

- Dès la phase préfermentaire, il convient d'être particulièrement vigilant sachant que toutes les espèces d'altération sont présentes et peuvent facilement se développer (10).
- Au terme de la FA, en cas de difficulté fermentaire (ralentissement ou arrêt), *Brettanomyces*, parfaitement bien adaptée aux conditions du milieu, peut se développer.
- Durant la phase de latence entre la fin de la FA et l'achèvement de la FML : *Brettanomyces* peut facilement se multiplier si la niche écologique est vide, c'est-à-dire si la population de bactéries lactiques est trop faible pour débiter la FML.
- Au terme de la FML : en cas de ralentissement ou d'arrêt de l'activité bactérienne, *Brettanomyces* peut aisément se développer.

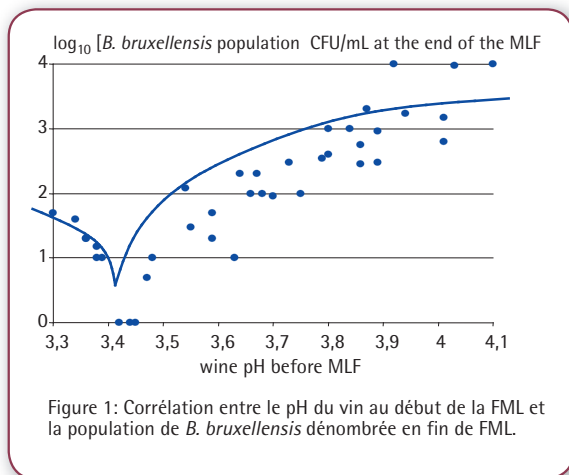
Cette parfaite maîtrise des étapes clefs de la vinification implique :

- une meilleure compréhension des interactions microbiennes
- le recours à des techniques de vinification parfaitement maîtrisées
- l'utilisation d'outils analytiques donnant une vision globale de la diversité microbienne.

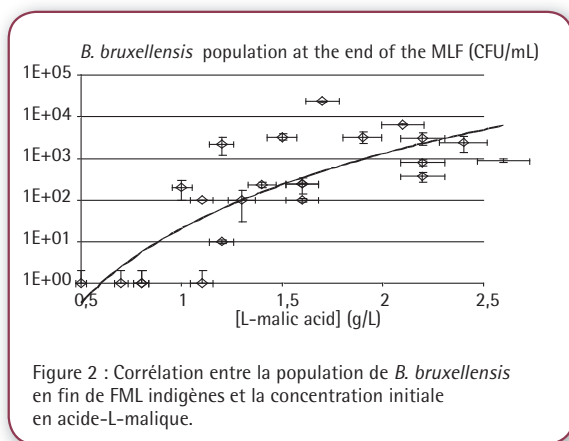
1 Interactions avec la matière première

La constitution chimique du vin dépend bien évidemment de la matière première. Du fait de leur composition chimique, certains vins sont plus exposés aux altérations que d'autres.

A titre d'exemple, les vins ayant un pH extrême, c'est-à-dire élevé ou très faible, sont plus sensibles au développement de *Brettanomyces*. Les faibles pH ont un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques, retardant ainsi la stabilisation du vin et permettant donc le développement des levures d'altération. A l'inverse, les pH élevés sont favorables au développement de tous les micro-organismes, y compris des espèces d'altération (figure 1 page suivante).



Il existe également une corrélation très claire entre la teneur en acide malique du vin et la population de levures *Brettanomyces* au terme de la FML.



Ces vins "sensibles" doivent être détectés précocement.

En ce sens, sur moût, un degré potentiel élevé, un pH extrême très faible (< 3,4) ou élevé (> 3,7), une carence azotée, une teneur élevée en acide malique sont autant de paramètres favorables à un développement des germes d'altération.

Durant la FA, un TAV élevé, un pH extrême, des difficultés fermentaires, une faible population levurienne, sont également favorables à la croissance de *Brettanomyces*.

Enfin, durant la FML, un faible pH, une teneur élevée en acide malique, la présence de SO₂ libre résiduel, une teneur trop élevée en SO₂ total, des difficultés fermentaires, une population bactérienne insuffisante et / ou inadaptée augmentent le risque d'altération.

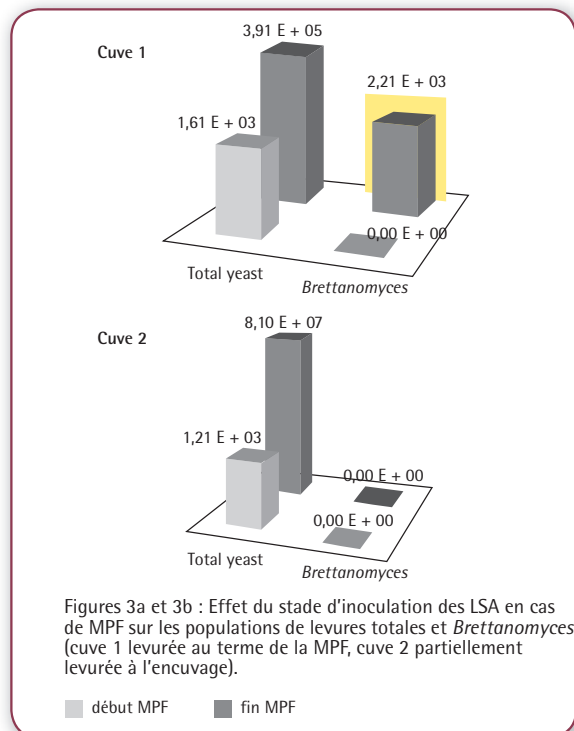
Il est bien évident qu'une détection précoce de ces paramètres est indispensable pour lutter efficacement contre *Brettanomyces*.

2 Interactions avec les techniques de vinification et entre les micro-organismes

A) Phase préfermentaire

Afin d'illustrer les interactions microbiennes avec les techniques de vinification en phase préfermentaire, nous avons choisi de présenter un essai de macération pré-fermentaire (MPF) mené à échelle industrielle.

La cuve 1 est levurée au terme de la phase de macération tandis que la cuve 2 est partiellement levurée à l'encuvage. Bien évidemment, les conditions de macération (12°C / 3 jours) ainsi que la souche de levure sont identiques dans les 2 modalités.



Les figures 3a et 3b présentent les populations de levures totales et de levures *Brettanomyces*, au début ainsi qu'au terme de la MPF.

En fin de macération, on ne dénombre pas de levures d'altération dans la cuve ayant bénéficié d'un levurage à l'encuvage tandis que cette population s'élève à 2,2.10³ UFC/mL (Unité Formant Colonie / mL) dans la cuve levurée seulement au terme de la MPF.

La cuve 1 renferme également une population élevée de levures indigènes en fin de macération. A tel point que cela rend improbable l'implantation d'un levain sélectionné. En effet, afin de garantir l'implantation d'une LSA, le ratio entre la population de levures indigènes et la population de levures sélectionnées doit être de 100 (1). Dans le cas de la cuve 1, levurée à 20 g/hL soit 10⁶ cell/mL, pour une population de levures indigènes s'élevant à 3,9.10⁵ cell/mL, ce ratio est seulement de 10, ce qui compromet l'implantation de la souche inoculée. Il est donc bien évident que lorsque la microflore indigène domine, il existe un risque élevé d'échec d'implantation de la LSA, pouvant engendrer des difficultés fermentaires.

Il est intéressant de revenir sur le cas de la cuve 2 pour laquelle aucune contamination n'a été observée et l'implantation du levain inoculé a été accomplie avec succès.

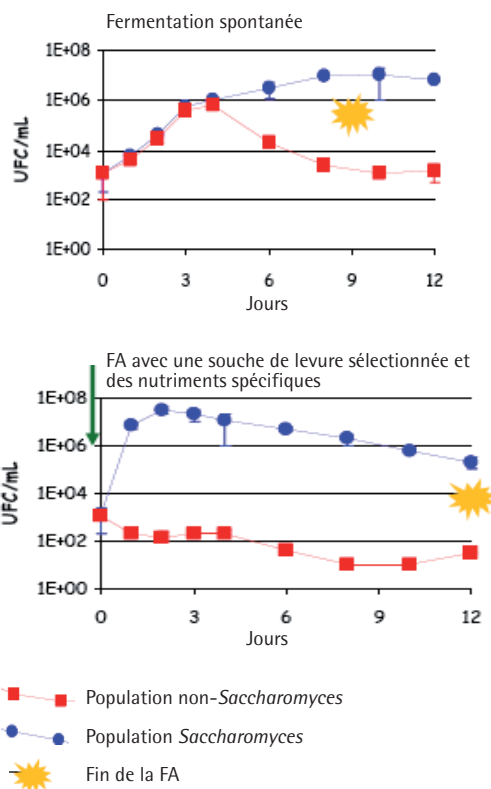
Dans cette cuve, nous avons réalisé un premier levurage à 5 g/hL à l'encuvage, suivi d'un second levurage avec la même souche à 15 g/hL au terme de la MPF, avant la remontée en température de la cuve.

Lors de cette seconde inoculation, les levures ont été réhydratées en présence d'un préparateur de levures permettant d'apporter à la levure des facteurs de croissance et de survie. Pour cette modalité, l'analyse génétique réalisée en milieu de FA a confirmé l'implantation du levain inoculé.

En cas de MPF, afin de maîtriser parfaitement le process et d'éviter des altérations microbiologiques, il est donc vivement recommandé de travailler avec un levurage fractionné (3).

B) Phase fermentaire

Afin d'illustrer la nécessité d'une parfaite maîtrise de la phase fermentaire, nous présentons ici un essai comparant une FA spontanée à une FA réalisée avec un levain sélectionné et des nutriments spécifiques. Précisons que cet essai a été mené à échelle industrielle.



Figures 4a et 4b : Intérêt de l'utilisation d'un levain sélectionné et de nutriments spécifiques pour une meilleure maîtrise de l'écosystème microbien. (Renouf, 2006).

Comme présenté aux figures 4a et 4b, dans le cas de la FA réalisée avec des levures indigènes, la population non-*Saccharomyces* est relativement élevée en fin de FA (de l'ordre de 10^4 UFC/mL). A l'inverse, dans le cas de la FA réalisée par un levain sélectionné, cette population reste inférieure à 10^2 UFC/mL. L'analyse génétique met en évidence une population *Brettanomyces* de 10^3 UFC/mL, avec une teneur élevée en éthyl-4-phénol pour la fermentation spontanée tandis que le lot ensemencé ne présente aucun signe d'altération (tableau 1).

Fermentation spontanée	FA avec une souche de levures sélectionnées et des nutriments spécifiques
Population <i>Brettanomyces</i> (UFC/mL)	
6.10^3 / mL	6.10^1 / mL
Ethyl-4phénol (µg/L)	
430	45

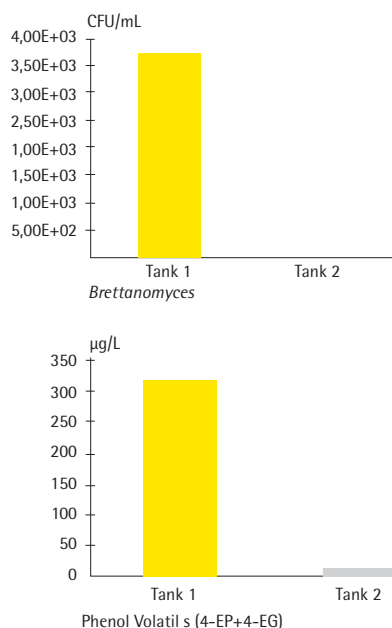
Tableau 1 : Intérêt de l'utilisation d'un levain sélectionné et de nutriments spécifiques pour une meilleure maîtrise de l'écosystème microbien. (Analyses réalisées en fin de FA, Renouf, 2006).

Ceci démontre clairement que l'emploi d'un levain sélectionné permet d'éviter les altérations microbiennes du fait de l'occupation de la niche écologique par des micro-organismes d'intérêt œnologique.

En effet, en cas de difficultés fermentaires (arrêt ou ralentissement), il existe un risque élevé d'altération par *Brettanomyces* car elles sont parfaitement adaptées aux conditions du milieu.

Afin d'illustrer ceci, nous avons choisi de présenter un essai comparant 2 modes de préparation du levain. Deux cuves sont inoculées avec la même souche de levures à hauteur de 20 g/hL. Pour l'une des

deux cuves, un préparateur de levures est utilisé lors de la phase de réhydratation (30 g/hL). Les conditions de fermentation sont strictement identiques pour les deux cuves, à l'exception de l'utilisation de ce préparateur (figures 5a et 5b suivantes).



Figures 5a et 5b : Intérêt de l'utilisation de nutriments spécifiques pour une meilleure maîtrise de l'écosystème microbien cuve 1 : LSA réhydratées sans préparateur de levures, cuve 2 ; LSA réhydratées en présence d'un préparateur de levures, analyses réalisées en cours de FML.

L'activité levurienne de la cuve pour laquelle les LSA ont été réhydratées sans préparateur de levures (cuve 1) s'est arrêtée après 15 jours. Au moment de l'arrêt, l'acidité volatile s'élevait à 0,5 g/L d' H_2SO_4 . Pour l'autre cuve (cuve 2), après 10 jours, la FA était terminée avec une acidité volatile tout à fait correcte.

La cuve 1 a connu des difficultés de réalisation de la FML, à tel point qu'un suivi microbiologique a été réalisé : la population de *Brettanomyces* dépassait 10^3 UFC/mL avec une teneur élevée en éthyl phénols.

Notons que la cuve 2 ne présentait aucun signe d'altération.

Comment expliquer ces résultats ?

Dans cet essai, le moût présentait un certain nombre de facteurs de stress pour les levures : fort degré potentiel (14 % Vol.) et carence azotée (70 mg/L d'azote assimilable), le tout associé à un pH élevé favorable à la croissance des germes d'altération.

Dans ces conditions, le préparateur de levures a permis de maintenir une population levurienne sélectionnée dans un bon état physiologique. L'occupation de la niche écologique par ces levures s'est opposée au développement précoce de *Brettanomyces*.

c) Phase de latence entre FA et FML

Pour terminer sur les étapes "à risques" de la vinification, nous abordons la phase de latence entre FA et FML.

Comme nous l'avons précédemment exposé, à ce stade de la vinification, *Brettanomyces* peut facilement se développer. Dans l'exemple présenté à la figure 6, au terme de la FA, la population de bactéries lactiques est particulièrement faible et l'on constate que leur croissance est concomitante à celle des *Brettanomyces*. Ces dernières atteignent ainsi rapidement un niveau de population très alarmant.

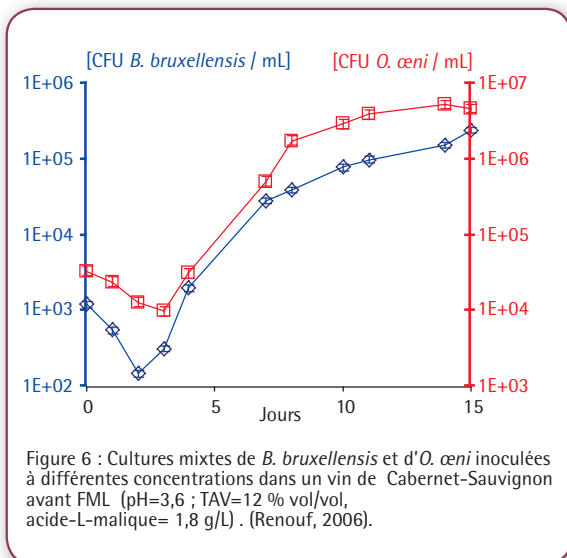


Figure 6 : Cultures mixtes de *B. bruxellensis* et d'*O. oeni* inocuées à différentes concentrations dans un vin de Cabernet-Sauvignon avant FML (pH=3,6 ; TAV=12 % vol/vol, acide-L-malique= 1,8 g/L) . (Renouf, 2006).

Ceci illustre parfaitement le fait que la phase de latence entre fin FA et fin FML doit être réduite au maximum. Il existe en effet une corrélation significative entre le nombre de jours nécessaires à l'achèvement de la FML et la population de levures *Brettanomyces* au terme de la FML (figure 7).

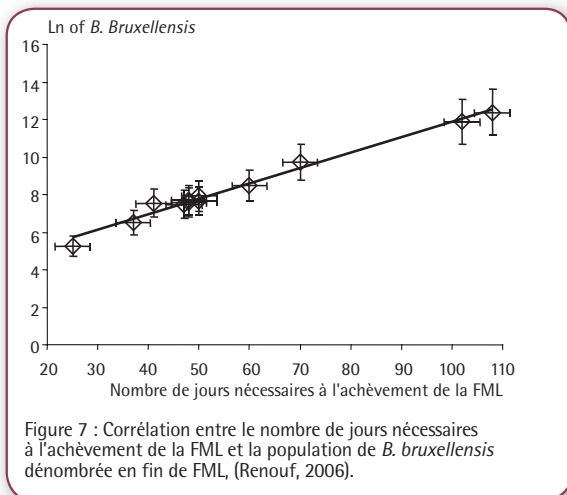


Figure 7 : Corrélation entre le nombre de jours nécessaires à l'achèvement de la FML et la population de *B. bruxellensis* dénombrée en fin de FML, (Renouf, 2006).

Autrement dit, plus la FML est languissante et plus *Brettanomyces* dispose de temps pour altérer le vin (4, 5, 9) ! Afin de réduire la durée de la FML, l'utilisation d'un levain malo-lactique est vivement recommandée. Il est même possible de supprimer cette phase de latence en mettant en œuvre une co-inoculation levures/bactéries.

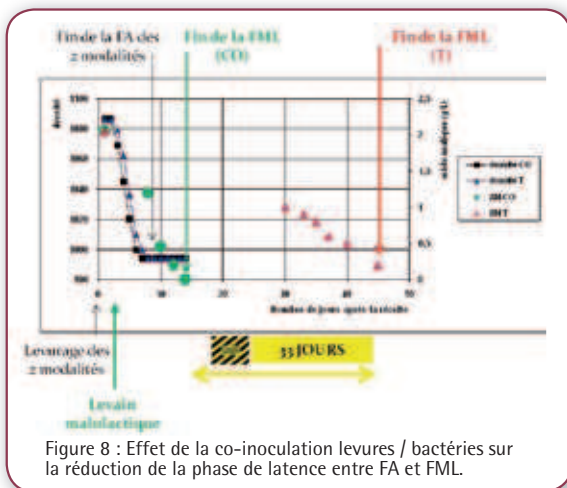


Figure 8 : Effet de la co-inoculation levures / bactéries sur la réduction de la phase de latence entre FA et FML.

A titre d'exemple, la figure 8 présente un essai mené à échelle industrielle et comparant une FML gérée en co-inoculation (ensemencement bactérien à J+2 après départ en FA) à une FML spontanée.

Pour la modalité co-inoculée, FA et FML sont achevées 12 jours après l'encuvage.

Pour la modalité témoin, il faut attendre 33 jours après achèvement de la FA pour pouvoir sulfiter le vin. Ces 33 jours constituent donc une période à haut risque pour le développement des germes d'altération, en particulier *Brettanomyces*.

Les différents exemples présentés illustrent bien la nécessité d'un management rigoureux des phases pré-fermentaire et fermentaire pour prévenir les altérations microbiennes. Ceci ne dispense pas les praticiens de réaliser un suivi microbiologique régulier.

Pour ce faire, plusieurs outils analytiques peuvent être mis en œuvre, du plus sophistiqué au plus simple :

- PCR quantitative : technique d'analyse génétique permettant la détection rapide des levures *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, bactéries lactiques productrices d'amines biogènes...
- Microscopie à épifluorescence : technique permettant le dénombrement rapide de tous les micro-organismes vivants.
- Dénombrement sur milieu de culture spécifique : technique d'analyse permettant le dénombrement des germes viables cultivables après culture sur milieux sélectifs : *Brettanomyces*, bactéries acétiques, bactéries lactiques..

Suivant le niveau de précision souhaité et l'urgence de l'analyse, l'une ou l'autre de ces techniques peut être mise en œuvre afin de s'assurer de la maîtrise de la microflore. Toute dynamique de croissance des germes d'altération doit alerter le vinificateur.

L'enjeu pour les praticiens consiste donc à contrôler et dominer l'écosystème microbien avec une microflore sélectionnée. Pour ce faire, il convient d'atteindre, ce que nous nommerons "le chiffre magique".

En effet, lorsque la population de *Saccharomyces* ou bien d'*Cenococcus* est supérieure à 10⁶ UFC/mL, les autres micro-organismes voient leur population significativement décliner.

Pour illustrer cette théorie, nous avons réalisé des co-cultures de *Brettanomyces* et *Cenococcus* : lorsque l'une de ces populations est supérieure à 10⁶ UFC/mL, l'autre ne parvient pas à se multiplier (résultats non présentés, 7,8).

Afin d'atteindre ce niveau de populations quelques règles simples s'imposent :

- Travailler avec des souches (levures et bactéries) sélectionnées pour leurs capacités fermentaires.
- Inoculer le plus précocement possible :
 - pour les levures, à l'encuvage (possibilité de levurage fractionné en cas de MPF)
 - pour les bactéries, d'un point de vue microbiologique, la co-inoculation est certainement la technique la plus pertinente.
- Fournir aux souches sélectionnées tous les éléments nutritifs nécessaires à leur croissance et leur survie dans le milieu.

Conclusion

Les différents exemples présentés mettent clairement en évidence la nécessité d'une parfaite gestion des phases préfermentaire et fermentaire pour réduire les risques d'altération microbienne.

L'objectif pour les vinificateurs consiste donc à maîtriser et dominer l'écosystème microbien avec une microflore sélectionnée. Si cet objectif est atteint, la phase d'élevage peut être abordée sereinement avec une faible population de germes d'altération. Dans le cas inverse, il est fort probable que l'on débute la phase d'élevage avec un vin renfermant une population de *Brettanomyces* élevée, qui rappelle le, est parfaitement adaptée aux conditions du milieu : présence d'alcool, faible teneur en éléments nutritifs, présence

de SO₂, absence d'oxygène... La maîtrise de l'écosystème durant les phases préfermentaire et fermentaire conditionne donc en partie le bon déroulement de la phase d'élevage.

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier le Professeur Aline Lonvaud-Funel de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux pour avoir encadré les travaux de thèse de Vincent Renouf dont sont issus certains des résultats présentés dans cet article.

Références bibliographiques

- 1 Delteil D. 1990. *Le levurage en Œnologie*. Cevilar.
- 2 Millet V. 2001. *Dynamique et survie des populations bactériennes dans les vins rouges au cours de l'élevage : interactions et équilibres*. Thèse de doctorat de l'université Victor Segalen Bordeaux 2.
- 3 Murat ML et Gourraud C. 2008. *Macération préfermentaire en rouge : maîtrise des risques et alternatives*. RFCE. N° 230.
- 4 Renouf V., Gindreau E., Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2005. *Microbial changes during malolactic fermentation in red wine elaboration* J. Int. Sc. Vigne Vin. N°39, 179-190
- 5 Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2005. *Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria*. Aust. J. Grape Wine Res. N°11, 316-327.
- 6 Renouf V. 2006. *Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin. : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du vin*. Thèse de Doctorat. INP de Toulouse.
- 7 Renouf V., Lonvaud-Funel A., 2007. *Development of an enrichment medium to detect Dekkera/Brettanomyces bruxellensis, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries*. Microbiol. Res. N°161, 154-167
- 8 Renouf V., Lonvaud-Funel A., Coulon J., 2007. *The origin of Brettanomyces bruxellensis* in wines: A review*. J. Int. Sc. Vigne Vin, N°41, 161-173
- 9 Renouf V., Murat ML. 2008. *L'utilisation de levains malolactiques pour une meilleure maîtrise du risque Brettanomyces*. Revue des Œnologues, N°126, 11-14.
- 10 Zott K, Miot-Sertier C., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Masneuf-Pomarède I., 2008. *Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking*. Int. J. Food Microbiol. N°125, 197-203.

NOTES

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....