# ioprotection des vins biologiques uel impact en vinification n rouge traditionnelle ?

## artie 1/2 : Résultats des essais en conditions xpérimentales

ile Pic[1], Philippe Cottereau[2], Daniel Granès[1], Noël Laurens[1], Valérie Pladeau[3], Nicolas Richard[4]
oupe ICV. [2] IFV Nîmes – Rodilhan – France.
sociation interprofessionnelle Sudvinbio. [4] Inter Rhône.

**bleau 1 : Caractéristiques des matrices travaillées en macération traditionnelle.**

| tenaire | Matrice | TAP en % | N ass en mg/l | État sanitaire | Remarque |
|---|---|---|---|---|---|
| | Syrah 2015 | 15,9 | 104 | Altérée | |
| | Cabernet-Sauvignon 2015 | 13,3 | 146 | Sain | |
| | Syrah 2015 | 11,8 | 120 | Début d'altération | Récolte anticipée |
| | Syrah 2016 | 15,0 | 200 | Sain | |
| | Grenache 2016 | 11,9 | 170 | Sain | Sous-maturité |
| | Mourvèdre 2017 | 11,6 | 86 | Contamination artificielle ($10^{E}$ 6/ml *Brettanomyces* + $10^{E/ml}$ 6 *Kloeckera*) | Sous-maturité |

**bleau 2 : Différents modes de bioprotection, avec des espèces pures, mis en œuvre en fication rouge traditionnelle à la récolte, 4 à 6 heures avant encuvage.**

| Matrices | Modalités de bioprotection en préfermentaire | | | | Relevurage à l'encuvage (pour la FA) |
|---|---|---|---|---|---|
| | Sulfitage | *Torrulaspora d.* | *Saccharomyces* | *Metchnikowia f.* | |
| | 5 g/qt | | | | oKay® 20 g/qt |
| 2015 ICV | 0 | | | | oKay® 20 g/qt |
| | | Tandem® 4 g/qt **R** | | | oKay® 20 g/qt |
| | | | oKay® 30 g/qt **NR** | | rien |
| | 5 g/qt | | | | oKay® 20 g/qt |
| 2015 ICV | 0 | | | | oKay® 20 g/qt |
| | | Tandem® 4 g/qt **R** | | | oKay® 20 g/qt |
| | | | oKay® 30 g/qt **NR** | | rien |
| | 5 g/qt | | | | oKay® 20 g/qt |
| ah 2016 ICV | 0 | | | | oKay® 20 g/qt |
| | | Tandem® 10 g/qt **NR** | | | oKay® 20 g/qt |
| | | | oKay® 30 g/qt **NR** | | rien |
| | 5 g/qt | | | | X5® 20 g/qt |
| | 0 | | | | X5® 20 g/qt |
| ah IFV 2015 | | Tandem® 4 g/qt **R** | | | X5® 20 g/qt |
| | | | oKay® 4 g/qt **R** | | X5® 20 g/qt |
| | | | oKay® 4 g/qt **R** | | rien |
| | 5 g/qt | | | | L 2323® 20 g/qt |
| nache 2016 IR | | Tandem® 4 g/qt **R** | | | L 2323® 20 g/qt |
| | | | L 2323® 25 g/qt **R** | | rien |
| | 5 g/qt | | | | L 2323® 20 g/qt |
| | 0 | | | | L 2323® 20 g/qt |
| urvèdre 2017 IR * | | Biodiva® 4 g/qt **R** | | | L 2323® 20 g/qt |
| | | | L 2323® 25 g/qt **R** | | rien |
| | | | L 2323® 25 g/qt **NR** | | rien |
| | | | | Gaïa® 5 g/qt **R** | L 2323® 20 g/qt |

*ntamination artificielle de l'ensemble des modalités par Brettanomyces b., au stade de la récolte, à 10E06 UFC/ml.*
*= non réhydratée. **R** = réhydratée.*

### Introduction

Est-il encore nécessaire de le rappeler ? La tendance est à la baisse, voire à la non-utilisation du dioxyde de soufre, en réponse à une demande forte des marchés mais aussi des producteurs. Les raisons de ces nouvelles pratiques sont multiples :
– prise en compte de ses effets irritants sur les consommateurs les plus sensibles et de leurs préoccupations *(Foulonneau, 2002)*;
– à teneur trop élevée, risque d'impact négatif de ce composé sur les profils organoleptiques des vins (accroissement de la sécheresse des vins, présence de notes irritantes, réduction des notes fruitées de certains vins *(Peynaud, et al., 1991))*;
– accroissement éventuel de production de notes soufrées en fermentation *(Cleroux, et al., 2015)*.
Malheureusement, la polyvalence de ce composé le rend unique et difficile à remplacer. En effet, outre le rôle antiseptique de sa forme moléculaire ($H_2SO_3$, appelée aussi $SO_2$ actif) *(Deveze, 1977)*, il présente non seulement un effet antioxydant *(Gayon-Ribéreau, 1933)* et antioxydasique mais aussi un effet solvant.
Aucun autre intrant ne présente une telle polyvalence, la réduction de l'emploi de cet additif conduit donc à chercher des alternatives à chacune de ces fonctions. C'est dans ce contexte qu'est apparu le concept de bioprotection : le $SO_2$, traditionnellement apporté pendant les opérations préfermentaires, est remplacé par un apport précoce de micro-organismes sélectionnés. Ces micro-organismes se développeraient au détriment de la flore indigène, l'empêchant de se multiplier et induisant ainsi son élimination *(Delaherche, et al., 2016)*.
L'effet antiseptique du $SO_2$ apporté en opérations préfermentaires permet de diminuer significativement le niveau global de contamination par la flore indigène, afin d'une part, d'éviter que l'activité de cette flore ne conduise à des altérations irréversibles des jus et d'autre part, de faciliter l'implantation des levures fermentaires que l'on veut voir réaliser la fermentation alcoolique. Les micro-organismes composant cette flore indigène sont majoritairement des non-*Saccharomyces* dont la plupart sont plus sensibles au $SO_2$ que les *Saccharomyces* sp. *(Lonvaud-Funel, et al., 2010)*.
De fait, pour que les pratiques de bioprotection puissent réellement être considérées comme des alternatives au sulfitage dans les étapes préfermentaires, il faut pouvoir mesurer une baisse significative de la flore indigène présente au moment de l'apport des levures fermentaires.
Récemment, plusieurs travaux portant sur l'intérêt de la bioprotection effectuée avec différentes espèces de levures ont été publiés *(Gerbaux V., 2015; Pillet, 2016; Delaherche, et al., 2016)*.
Cependant, aucune de ces études ne s'est intéressée aux vinifications en rouge traditionnelles ni à l'emploi éventuel de levures *Saccharomyces*. Par ailleurs, pour certains de ces travaux, l'évaluation de l'impact microbiologique a été réalisée *via* des mises en culture sur milieux gélosés qui ne permettent pas de distinguer entre elles les différentes espèces de non-*Saccharomyces*.
Dès 2015, l'IFV, Inter Rhône et l'ICV se sont associés autour de Sudvinbio pour évaluer, en condition expérimentale l'intérêt de l'utilisation de *Saccharomyces* (pratique moins onéreuse) et la mise en œuvre de la bioprotection dès la récolte du raisin.

**Figures 1 : Ⓐ Ⓑ Évaluation des espèces en présence** (par PCR ITS) **et contrôles d'implantation des levures *Saccharomyces*. Mesures faites à l'encuvage** (par Profil Inter Delta). Fait sur 10 colonies prélevées sur milieu levure totale. Dénombrement des levures totales fait sur milieu YEPD.

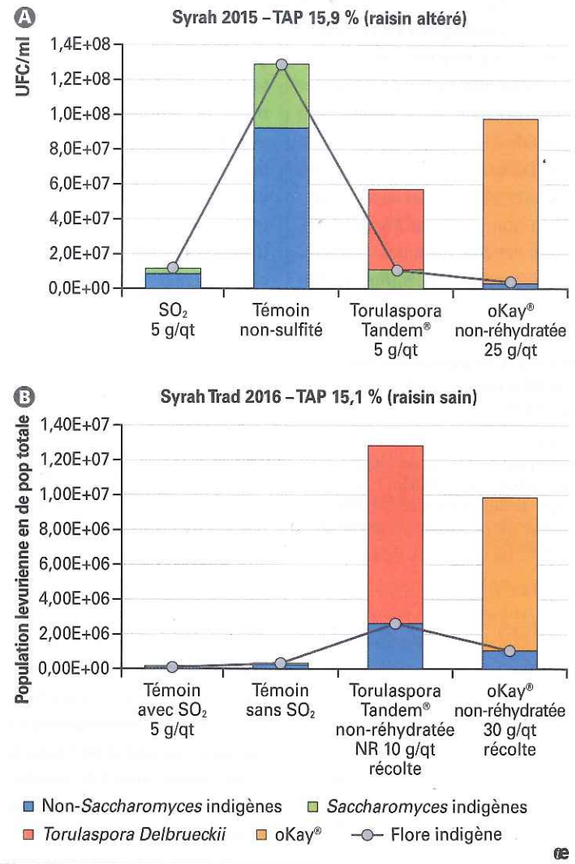
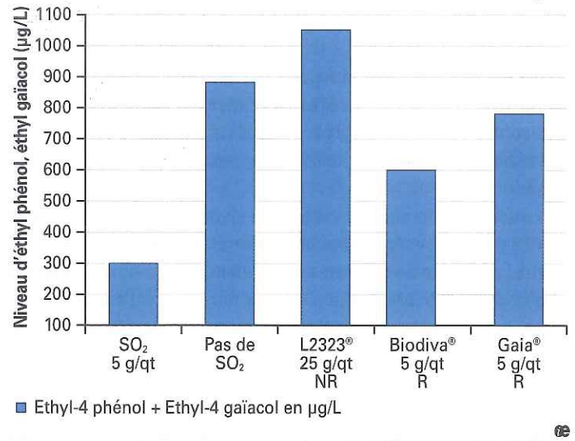



**Figure 2 : Niveau de production en Ethyl-4 Phénol + Ethyl-4 Gaïacol par les *Brettanomyces*.**




### Matériel microbiologique

La nécessité de réhydrater les LSA avant leur incorporation dans les jus est une pratique recommandée par tous les spécialistes pour assurer une implantation satisfaisante des levures et un déroulement régulier des fermentations alcooliques *(Salmon, 2017)*. Le comportement en non-réhydratation des levures de la gamme ICV-Lallemand a été évalué par l'ICV. La comparaison, pour une levure donnée, des durées de fermentation alcoolique à 20 °C, obtenues en inoculant soit à 20 g/hl après réhydratation, soit à 30 g/hl sans réhydrater, a mis en évidence de grandes différences entre levures (résultats non-présentés). Peu de levures peuvent être utilisées sans réhydratation et assurer un achèvement satisfaisant des fermentations alcooliques. L'ICV a donc choisi dans le cadre de ces essais d'utiliser la levure Okay®, qui s'avère dans cette gamme être la plus intéressante.
De son côté, Inter Rhône a préféré travailler avec la levure Lalvin 2323®, jugée plus adaptée aux matrices rhodaniennes, bien que son aptitude à bien fermenter en l'absence de réhydratation n'ait pas été validée.
Nous présenterons dans cet article, les résultats des essais réalisés avec des préparations commerciales en espèce pure : Tandem® TD et Biodiva® *(Torulaspora delbrueckii)*, Gaia® *(Metchnikowia fructicola)* pour lesquelles nous avions des informations en termes de métabolisme, besoins nutritionnels et éventuelles interactions avec les *Saccharomyces*.

### Résultats

La bioprotection a été mise en place par ajout des levures sur du raisin éraflé non-foulé et non-sulfité, stocké 4 à 6 heures à température ambiante afin de simuler à la fois la récolte en vendange mécanique, et le temps de transport entre la parcelle et la mise en cuve. Pour chaque matière première ***(tableau 1)***, plusieurs modalités ont

é comparées, incluant systématiquement 1 lot témoin sulfité à la colte et 1 lot témoin non-sulfité pendant les phases préfermentaires. s essais mis en œuvre sont décrits dans le ***tableau 2.***

### fet de la bioprotection sur le développement e la flore en phase préfermentaire

s contrôles microbiologiques effectués à l'encuvage, montrent s résultats variables en fonction des matrices, des levures et des ses utilisées.

levure oKay® lorsqu'elle est ajoutée en bioprotection à forte dose = 25 g/qt, même non-réhydratée) s'implante bien ***(figures 1)***. Par ntre, employée en bioprotection à faible dose, même réhydratée g/qt-Syrah IFV 2015), elle n'est pas retrouvée à l'encuvage: on rouve essentiellement la *Kloeckera* sp. et une *Saccharomyces* sp. digène (à 30 %) pour une des deux modalités.

La levure *Torulaspora* Td s'est bien implantée pour 3 essais et n'est présente qu'à 10 % sur l'essai IFV au moment de l'encuvage.

Avec *Torulaspora* Td ou avec Okay®, la moitié des essais montre que la flore indigène reste présente en quantité comparable à la celle mesurée sur les modalités sulfitées et en quantité réduite par rapport aux modalités non-sulfitées ***(figure 1A)***, mais cet effet n'est pas retrouvé sur les autres essais ***(figure 1B)***.

**Tableau 3: Évaluation des espèces en présence** (par PCR ITS) **et contrôles d'implantation des vures à mi-fermentation alcoolique** (par Profil Inter Delta). **Fait sur 10 à 30 colonies prélevées sur lieu levure totale. Dénombrement des levures totales fait sur milieu YEPD.**

| atière I | Modalité à la récolte | Relevurage à l'encuvage à 20 g/qt R | Nombre levures (UFC/ml) | levures non-*Saccharomyces* (%) | Levure apportée pour la fermentation alcoolique dans la population de levures totale (%) | Durées de fermentation alcoolique (jours) | Ac Volatile en g $H_2SO_4$/L en fin FA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $SO_2$ 5 g/qt | Okay® | 1,70E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 12 | 0,18 |
| yrah 15 CV) | Pas de $SO_2$ | Okay® | 3,20E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 12 | 0,15 |
| | *Torula* Tandem® 5 g/qt **R** | Okay® | 1,70E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 12 | 0,18 |
| | oKay® 25 g/qt **NR** | aucun | 2,80E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 12 | 0,11 |
| | $SO_2$ 5 g/qt | Okay® | 1,30E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 8 | 0,28 |
| | Pas de $SO_2$ | Okay® | 7,70E+07 | < 10 % | > 90% (oKay®) | 8 | 0,28 |
| abernet-uvignon 15 | *Torula* Tandem® TD 5 g/qt **R** | Okay® | 1,10E+08 | 20 % *Torulaspora delbrueckii* | 80 % (oKay®) | 8 | 0,30 |
| | oKay® 25 g/qt **NR** | aucun | 1,20E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 7 | 0,24 |
| | $SO_2$ 4 g/qt | Okay® | 1,42E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 7 | 0,40 |
| | Pas de $SO_2$ | Okay® | 1,19E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 7 | 0,38 |
| yrah 16 | *Torula* Tandem® TD 10 g/qt **NR** | Okay® | 1,51E+08 | 20 % *Torulaspora delbrueckii* | 80 % (oKay®) | 7 | 0,37 |
| | oKay® 30 g/qt **NR** | aucun | 1,08E+08 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 7 | 037 |
| | $SO_2$ 5 g/qt | X5® | 2,5 E+07 | 20 % *Kloeckera* | > 30 % (X5®) *Saccharomyces* indigène 30 % | 10 | 0,39 |
| yrah 15 CV) | Pas de $SO_2$ | X5® | 2,0 E+07 | < 10 % | > 90 % (X5®) | 10 | 0,47 |
| | *Torula* Tandem® TD 4 g/qt **R** | X5® | 4,5 E+07 | 20 % *Torulaspora delbrueckii* | 80 % (X5®) | 10 | 0,50 |
| | oKay® 4 g/qt **R** | aucun | 5,0 E+07 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 10 | 0,39 |
| | oKay® 4/qt **R** | X5® | 3,5 E+07 | < 10 % | > 90 % (oKay®) | 10 | 0,43 |
| | $SO_2$ 5 g/qt | L2323® | 5,0 E+07 | < 10 % | > 90 % (L2323®) | 9 | 0,18 |
| enache 16 R) | Tandem® TD 25 g/qt **R** | L2323® | 7,8 E+07 | 60 % *Torulaspora delbrueckii.* | 40 % (L2323®) | 9 | 0,19 |
| | L 2323® 25 g/qt **R** | aucun | 6,3 E+07 | <10 % | 40 % (L2323®) | 9 | 0,23 |
| | $SO_2$ 5 g/qt | L2323® | 2,4E+07 | nd | 80 % (L2323®) | 16 | 0,34 |
| | Pas de $SO_2$ | L2323® | 1,5E+07 | nd | 60 % (L2323®) | 16 | 0,38 |
| ourvèdre 17 R) | Biodiva 5 g/qt **R** | L2323® | 1,50E+07 | 50 % *Torulaspora delbrueckii* | 50 % (L2323®) | 24 | 0,47 |
| | L2323® 25 g/qt **NR** | aucun | 1,7E+07 | nd | 50 % (L2323®) | 16 | 0,40 |
| | Gaia® 5 g/qt **R** | L2323® | 2,50E+07 | nd | 100 % indigènes | 17 | 0,35 |

***R** = non réhydratée. **R** = réhydratée. **nd**: non déterminé.*

### Effet de la bioprotection sur les flores à mi-fermentation alcoolique

Entre 1 050 et 1 035 de densité, de nouveaux contrôles microbiologiques ont été effectués pour déterminer quelle levure était agent majoritaire de la fermentation alcoolique ***(tableau 3)***. Il a ainsi été montré que l'apport en bioprotection de Okay® réhydratée ou non-réhydratée, mais à forte dose, permettait de s'affranchir d'un nouveau levurage à l'encuvage tout en assurant une bonne implantation de cette levure et avec des niveaux de population classiques à ce stade de la FA.

Pour l'essai sur Syrah 2015 IFV, avec ou sans relevurage X5® à l'encuvage, c'est la souche apportée en bioprotection (Okay® réhydratée à 4 g/qt) qui s'implante, alors qu'elle n'est pas retrouvée après la phase préfermentaire.

Ces données questionnent sur les conditions opératoires et analytiques qui auraient pu influer le résultat: représentativité de l'échantillonnage et de l'analyse à l'encuvage, impact du transfert des échantillons, conditions de relevurage...

L'utilisation de L2323® à 25 g/qt en bioprotection, réhydratée ou non, n'a pas permis d'assurer une bonne implantation de cette levure qui représente, en 2017 comme en 2016, moins de 50 % des *Saccharomyces* à mi-fermentation alcoolique. Ce résultat confirme l'importance de tester préalablement la tolérance de cette levure à un apport précoce et à la non-réhydratation.

L'utilisation de *Torulaspora* Tandem®TD n'a pas compromis l'implantation des *Saccharomyces* Okay® et X5® apportées à l'encuvage (ou « en relevurage »), mais l'usage de Biodiva® en bioprotection a pénalisé l'implantation de L2323®. Ce résultat illustre la nécessité de connaître les éventuels risques d'incompatibilités entre levures lors de la mise en œuvre de telles pratiques.





À mi-fermentation alcoolique, une population résiduelle viable de *Torulaspora* d. reste détectable (20 % à 50 %) dans tous les essais.

*Metchnikowia f.* (Gaia®) ajoutée en bioprotection sur le Mourvèdre 2017 n'est pas retrouvée en cours de fermentation alcoolique. En l'absence des contrôles de populations à l'encuvage, il ne nous est pas possible de valider l'implantation de cette souche. N'étant pas fermentaire, il est logique de ne pas la retrouver en cours de FA. Par ailleurs, on ne retrouve pas non plus la *Saccharomyces* apportée au relevurage.

On peut relever que sur l'essai Syrah IFV, la FML s'est enclenchée spontanément sur la modalité non-sulfitée.

Sur 5 des 6 matrices, nous n'avons observé aucune différence nette tant en terme de cinétiques fermentaires et qu'en terme de niveau d'acidité volatile à la fin de la FA. Cependant, sur Mourvèdre, très fortement contaminé en *Brettanomyces*, nous observons une légère augmentation d'acidité volatile sur les modalités bioprotégées par *Torulaspora d.* Biodiva®, en lien avec une durée de fermentation alcoolique nettement plus longue que les autres modalités de l'essai.

Sur ces mêmes essais, on observe un léger effet de diminution de production des éthyl phénols ***(figure 2)*** par rapport au témoin non-sulfité. La diminution, constatée sur les modalités bioprotection (Biodiva® et Gaïa®), est nettement inférieure à celle obtenue sur la modalité sulfitée, qui a permis de rester en-dessous du seuil de perception.

### Conclusions

Ces essais réalisés en conditions expérimentales (minicuverie) ont mis en œuvre différentes modalités de bioprotection dans le cadre de la vinification en rouge traditionnelle.

Après une première année d'essais qui ne nous a pas permis de valider, aux doses d'apport préconisées de 5 g/qt, l'intérêt tant microbiologique qu'organoleptique de préparations commerciales composées de mélanges d'espèces (résultats non-présentés), nous avons opté pour des tests avec des levures « pures » de caractéristiques parfaitement connues.

Avec la non-*Saccharomyces* *Torulaspora delbrueckii* Tandem® TD, utilisée à 5 g/qt réhydratée ou 25 g/qt non-réhydratée, la souche devient majoritaire au sein de la flore présente à l'encuvage. Dans la moitié des cas, la quantité de flore indigène présente à l'encuvage est alors réduite par rapport au témoin non-sulfité et se rapproche du niveau obtenu avec un sulfitage à 5 g/qt à la récolte. Pendant la fermentation alcoolique, *Torulaspora* TD peut cohabiter et cofermenter avec la *Saccharomyces* apportée à l'encuvage. Le profil sensoriel n'a pas été impacté sur ces essais.

En deçà de 5 g/qt et en l'absence de réhydratation, *Torulaspora d.* est retrouvée en quantité minoritaire dans la flore à l'encuvage. L'usage d'une non-*Saccharomyces* fermentaire type *Torulaspora d.* en bioprotection peut cependant induire, d'une part, une concurrence vis-à-vis de l'azote assimilable pour la *Saccharomyces* utilisée pour réaliser la FA et d'autre part, un risque d'incompatibilité entre les souches.

Avec *Saccharomyces* en usage non-réhydratée, l'opérateur devra vérifier la tolérance de la souche à la non-réhydratation et apporter une dose suffisante pour garantir son implantation (> 25 g/qt). Cependant, bien qu'elle s'implante bien, elle n'empêche pas systématiquement le développement d'une flore indigène *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*.

Il est notable que oKay® ainsi utilisée est capable, sans nouvel apport de levures *Saccharomyces*, de réaliser la fermentation alcoolique. Cette pratique permet de s'assurer de l'absence d'éventuelles carences nutritives induites. En effet, les micro-organismes apportés en bioprotection ou ceux naturellement présents peuvent consommer une partie des micronutriments nécessaires à la *Saccharomyces* à venir au moment de l'encuvage.

Sur l'ensemble de nos essais, nous ne relevons pas de différences significatives sur les paramètres organoleptiques entre les modalités biocontrôle et le témoin non-sulfité. Ainsi en l'absence de défauts organoleptiques liés au développement d'éventuels contaminants microbiens, nous ne pouvons pas réellement conclure sur l'impact des pratiques de bioprotection sur la maîtrise des contaminants microbiologiques.

L'effet observé dans l'essai contaminé avec *Brettanomyces b.* devra être confirmé en condition de contamination plus réaliste.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, le terme de bioprotection, au sens où il a été proposé originellement peut être remis en question. En effet les apports précoces de micro-organismes sélectionnés ne conduisent pas systématiquement à leur implantation. Par ailleurs, lorsque cela se produit, il n'est pas garanti que la présence et l'activité des flores indigènes soient limitées. Ces essais réalisés en conditions expérimentales ont été complétés par une validation à l'échelle de la production, notamment vis-à-vis de leur mise en œuvre. Ces travaux font l'objet d'un deuxième article. ■

***Remerciement:*** *Les auteurs remercient 1) la région Languedoc-Roussillon et la région Occitanie pour leur soutien financier, 2) Mégane Eoche-Duval, Baptiste Pontreau, Louise Tanguy, Anastasia Loskutova, Claudine Degueurce pour leur contribution très active à la réalisation de ces essais.*

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

***NDLR:*** *La deuxième partie de cet article sera publiée dans le n° 172 (juillet 2019)de la Revue des Œnologues.*