Etude expérimentale de l'effet conjoint du dicarbonate de diméthyle (DMDC) et du bisulfite de potassium sur *Brettanomyces* dans des vins secs.

Lucile Pic[1], Daniel Granès[2]

[1] : responsable Expérimentations Œnologie, Groupe ICV, La Jasse de Maurin 34970 Lattes,
[2] : directeur scientifique, Groupe ICV, La Jasse de Maurin 34970 Lattes,

A. Introduction

La modification du règlement RCE 606/2009 (règlement qui entre autre précise les intrants autorisés en œnologie et les conditions d'emploi acceptées) par le règlement d'exécution (UE) 315/2012 permet maintenant l'utilisation du dicarbonate de diméthyle (DMDC) en dehors des phases de conditionnement, sur des vins même secs, pour assurer leur stabilisation microbiologique.

Cette modification réglementaire relance l'intérêt qui peut être porté au DMDC pour un emploi sur les vins rouges en cours d'élevage.

De nombreux travaux ont été conduits sur le DMDC utilisé comme agent de mutage des vins liquoreux (Barbe, 2000) en remplacement ou en complément du SO_2. Comparativement au SO_2 à l'action lente et progressive celle du DMDC est rapide et brève (Divol *et al*. 2003). Les expérimentations réalisées par la DGCCRF en 2001 soulignent également que le DMDC agirait comme fongicide et non comme fongistatique.

Delfini *et al*. (2002) signalent que *Brettanomyces* est inhibée sur moût (avec une population initiale de 10^6 cellules/mL) avec 250 mg / L de DMDC.

Ough *et al*. (1988) ont montré que, en dessous de pH 3,8, 100 mg/L de DMDC assurent une stérilisation complète du vin, en l'absence de SO_2, même si la population de levure est supérieure à 10^7 cellules/mL. Les travaux plus récents de Bertrand *et al.* (2010) ont eux montré, qu'en l'absence de SO_2 actif, il fallait attendre plus de 3 semaines pour détecter un effet significatif du DMDC sur des niveaux de population élevés (10^4 à 10^6UFC/ml). Blateyron et al (2008) ont montré l'efficacité de 200 mg / L de DMDC au conditionnement sur des populations initiales inférieures à 10^4 UFC / mL.

D'après Grazietti (2006) l'action du DMDC est synergique à celle de l'anhydride sulfureux, et s'exerce donc de façon optimale en présence de taux de 20 à 25 mg / L de SO_2 libre.

Dans ce travail, nous avons souhaité évaluer sur des vins secs, en conditions de conservation simulant la cuve, l'impact de la synergie du DMDC avec le SO_2 en fonction de la quantité de SO_2 actif sur plusieurs matrices.

B. Matériel et méthode

1. Méthode

Trois niveaux de SO2 actifs ont été ciblés et maintenus pendant la durée de l'essai : 0.2 mg/L, 0.6 mg/L et 0.8 mg/L de SO_2 actif.

Pour les plus faibles niveaux de SO_2 actif (0,2 et 0,6 mg/L), nous avons étudié l'impact d'un ajout simultané de DMDC à la dose de 200 mg / L (Figure 1). Les souches de *Brettanomyces* sont implantées dans les vins selon un mode opératoire développé par l'ICV.

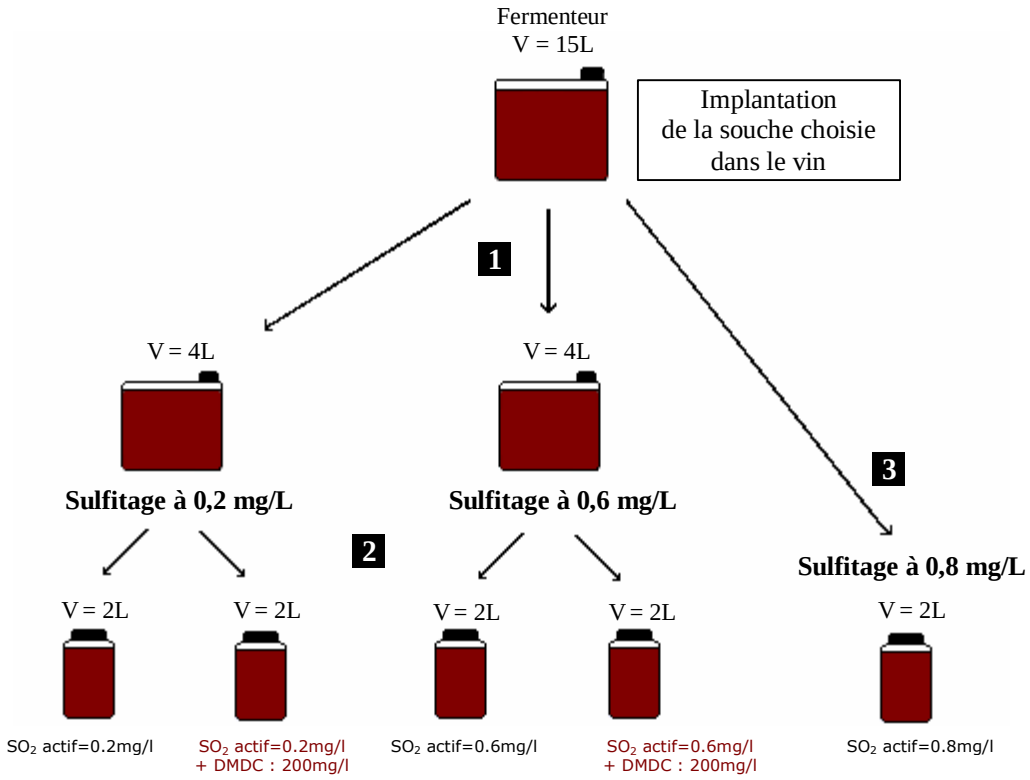


Figure 1 : Plan d'expérience pour mesurer l'impact du couple SO_2 actif / DMDC (200mg/l)

Une fois que les niveaux de population en *Brettanomyces* dans les fermenteurs atteignent un plateau (populations stables sur 3 jours consécutifs), les traitements (ajout de SO_2 et éventuellement de DMDC) sont effectués (Point Zéro des suivis).

Les essais sont réalisés en fermenteurs de deux litres et stockés en chambres thermostatées à 18°C.

Le suivi microbiologique de chaque essai est fait à 24h, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois et 2 mois après traitement des vins par mise en culture sur milieu YAC (Tableau 1) et incubation d'une semaine à 28°C.

Composé	Concentration
Glucose	20 g/L
Peptone	20 g/L
Agar	20 g/L
Extrait de levures	10 g/L
Chloramphénicol	100 mg/L
Cycloheximide	50 mg/L
Eau déminéralisée	Compléter au volume souhaité

Tableau 1 : Composition du milieu YAC pour le dénombrement de *Brettanomyces*

Un suivi de la teneur en SO_2 libre est effectué chaque semaine afin de réajuster la dose de SO_2 actif à la valeur cible.

2. Matériel

a) Origine des souches de *Brettanomyces bruxellensis*

Les deux souches de *Brettanomyces* choisies pour cette étude proviennent de caves coopératives méditerranéennes. Elles ont été isolées à partir de vins présentant des défauts organoleptiques, caractéristiques de *Brettanomyces*. L'ICV a isolée ces souches qui ont été identifiées comme différentes l'une de l'autre par la société ADN^{id}, spécialisée en biologie moléculaire, par génotypage, méthode basée sur la variabilité de la zone 5.8S de l'ARN ribosomal. Ces deux souches se sont avérées être très fréquemment retrouvées sur les vins de notre secteur d'activité (Blateyron et al, 2008)

b) Les matrices vins

Les essais ont été réalisés sur trois vins rouges, cépage Merlot (Tableau 2), fermentations malolactiques achevées et n'ayant subit aucun traitement bactéricide au préalable.

Vin	pH	Degré alcoolique (%)	Acidité totale (g H_2SO_4/L)	SO_2 actif initial (mg/L)	Sucres réducteurs (g/L)
637 - 08	3.48	13.30	4.38	<0.02	1.8
638 - 08	3.42	13.11	3.59	<0.02	1.3
642 - 08	3.47	13.78	3.18	<0.02	1.7

Tableau 2 : caractéristiques chimiques des vins

C. Résultats

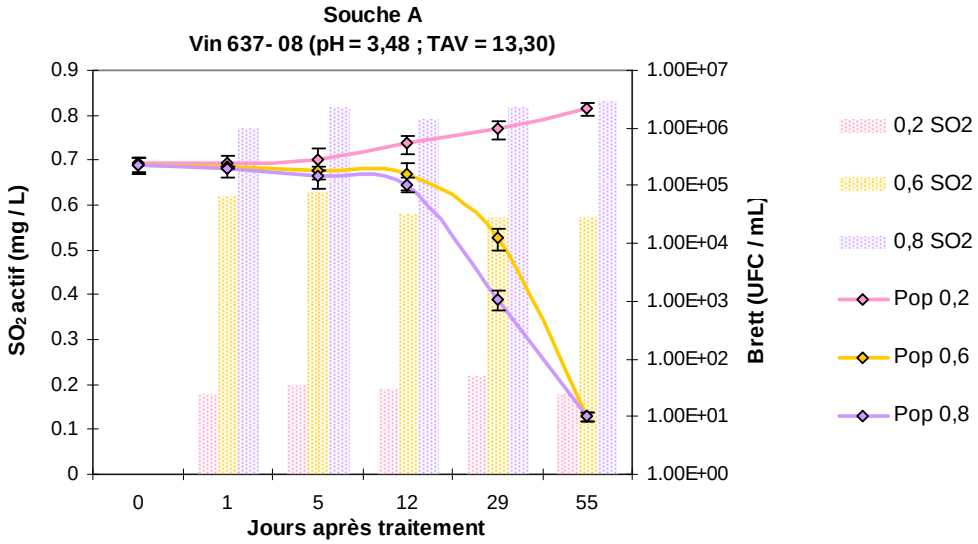
1. Efficacité des traitements au SO_2 et au DMDC sur les populations

a) Efficacité nette du SO_2 à partir de 0.6 d'actif

Pour la souche A de *Brettanomyces* implantée à $2{,}3.10^5$ UFC/ml avant le traitement, nous observons pour les trois matrices vin des effets comparables selon les traitements (Figure 2).

Pour les fermenteurs maintenus à 0,2 mg/L de SO_2 actif, la concentration en *Brettanomyces* reste constante jusqu'au 5ème jour ($2{,}3.10^5$ cellules/mL), puis augmente pour atteindre une valeur de $2{,}21.10^6$ cellules/mL.

Dans les fermenteurs traités à 0,6 et 0,8 mg/L en SO_2 actif, les populations déclinent dans les 24 heures qui suivent le sulfitage initial, puis chutent significativement à partir du 12ème jour, pour atteindre un niveau final de contamination inférieur à 10 UFC / mL (limite de détection pour un dénombrement sur gélose).



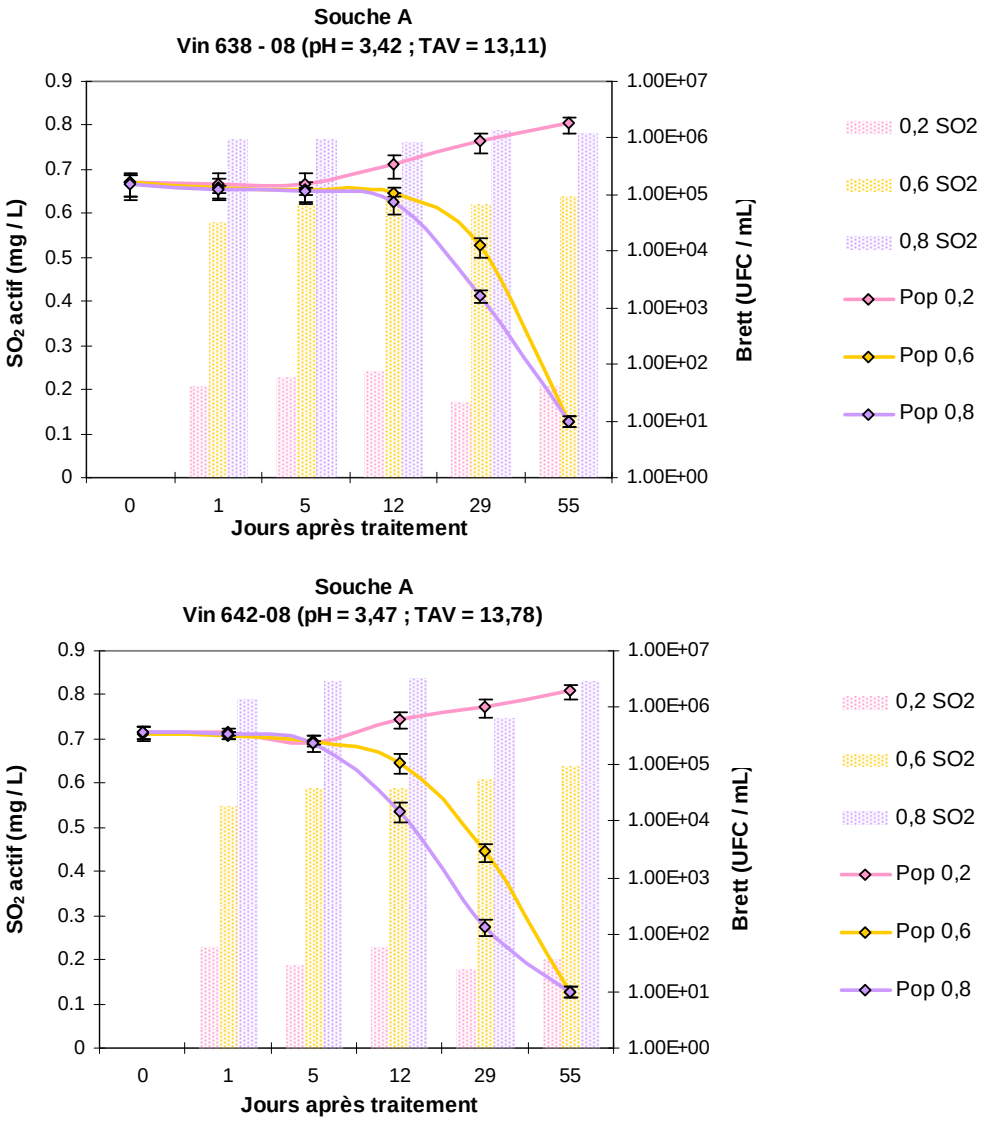


Figure 2 : Impact du niveau de SO_2 actif maintenu dans les vins sur le développement d'une population de *Brettanomyces* (Souche A) initialement implantée à 2.3 10^5 UFC/ml sur 3 matrices Merlot différentes-Niveaux de SO_2 actif mesurés en parallèle.

Les courbes obtenues pour les essais sur la souche B sont globalement comparables à celles de la souche A (Figure 3).

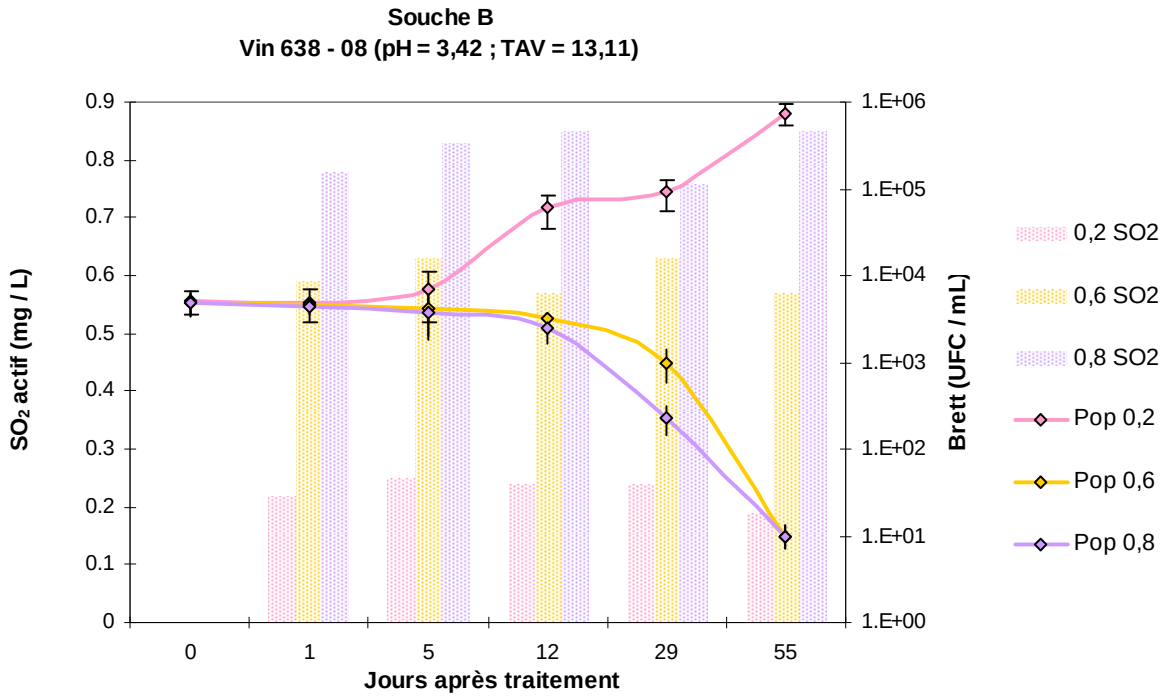


Figure 3 : Impact du niveau de SO_2 actif maintenu dans un vin sur le développement d'une population de *Brettanomyces* (Souche B) initialement implantée à 5 10^3 UFC/ml sur 1 matrices Merlot -Niveaux de SO_2 actif mesurés en parallèle.

Nous relevons cependant que le maintien de 0,6 mg/L de SO_2 actif sur la souche B conduit à 29 jours à une chute de 0,5 à 1 log de la population en *Brettanomyces* contre une baisse de 1 à 2 log pour la souche A.

De même pour des valeurs de SO_2 actif de 0,8 mg/L, le niveau de contamination de la souche B chute en 29 jours de 1 log contre 2 à 3 log pour la souche A.

Cependant, il ne nous est pas possible de conclure quant à une éventuelle différence de sensibilité au SO_2 des deux souches étant donné que l'inoculation effectuée a conduit à un niveau de contamination stabilisé autour de 10^3 cellules/mL avant traitement, soit 2 log de moins pour la souche B par rapport à la souche A.

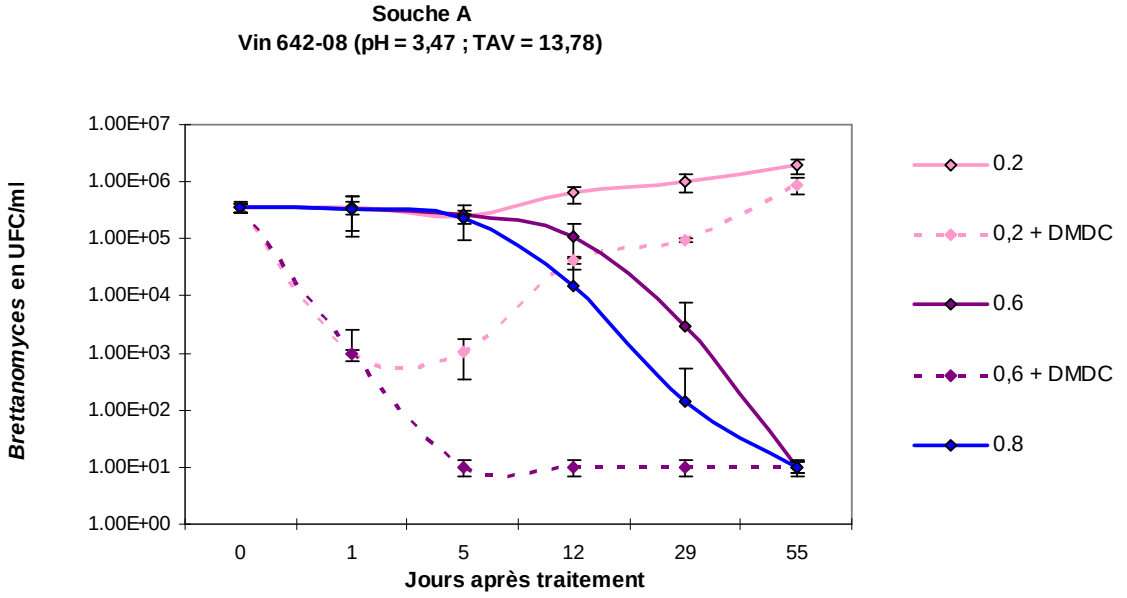
b) Intérêt du DMDC en association au SO_2

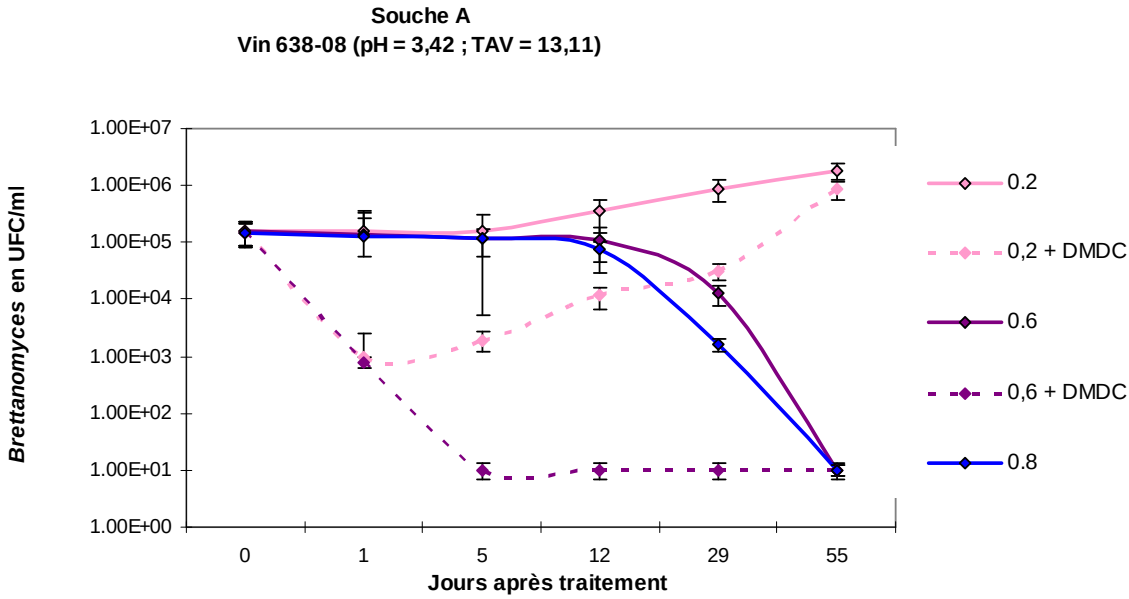
L'association de 200 mg / L de DMDC, entraîne une chute immédiate des populations qui tombent de $2{,}3.10^5$ UFC / mL à environ $1{,}0.10^3$ UFC / mL, même sur les niveaux les plus faibles de SO_2 actif.

Cependant, en l'absence de SO_2 actif en quantité suffisante, le niveau de population des *Brettanomyces* s'élève à nouveau à partir du $5^{ème}$ jour de traitement, pour finalement aboutir au même taux de contamination que la modalité à 0,2 mg/L de SO_2 actif sans DMDC.

Associé à 0,6 mg/L de SO_2 actif, l'ajout de 200mg/l de DMDC permet une baisse de la population plus importante, qui conduit dès le

5ème jour post traitement à un niveau de contamination inférieur à 10 UFC/mL. Ce faible niveau de contamination se maintient pendant les deux mois de suivi.





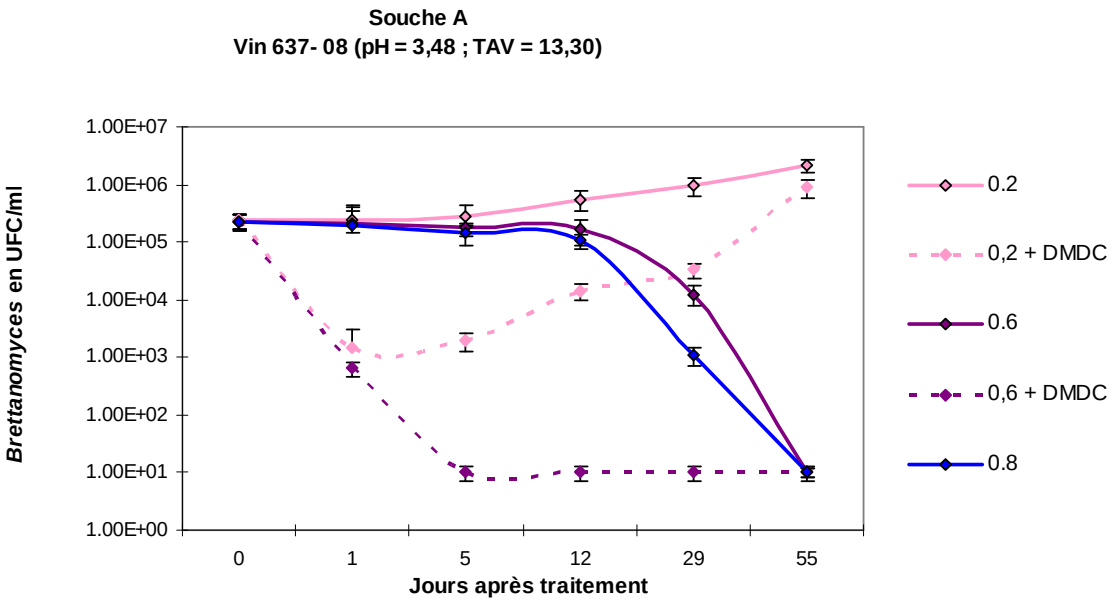


Figure 4 : Impact de la combinaison DMDC/SO_2 sur le développement d'une population de *Brettanomyces* (Souche A) initialement implantée à 2.3 10^5 UFC/ml sur 3 matrices Merlot différentes.

Comme pour l'effet du SO_2 seul, les mêmes tendances ont été obtenues pour les vins contaminés avec la souche *Brettanomyces* B : bien que le niveau d'inoculation initial soit plus faible (5.10^3 UFC / mL), le DMDC associé à une faible quantité de SO_2 actif (0.2mg/l) ne réduit pas suffisamment la population présente pour éviter une reprise de croissance après 5 jours. (Figure 5).

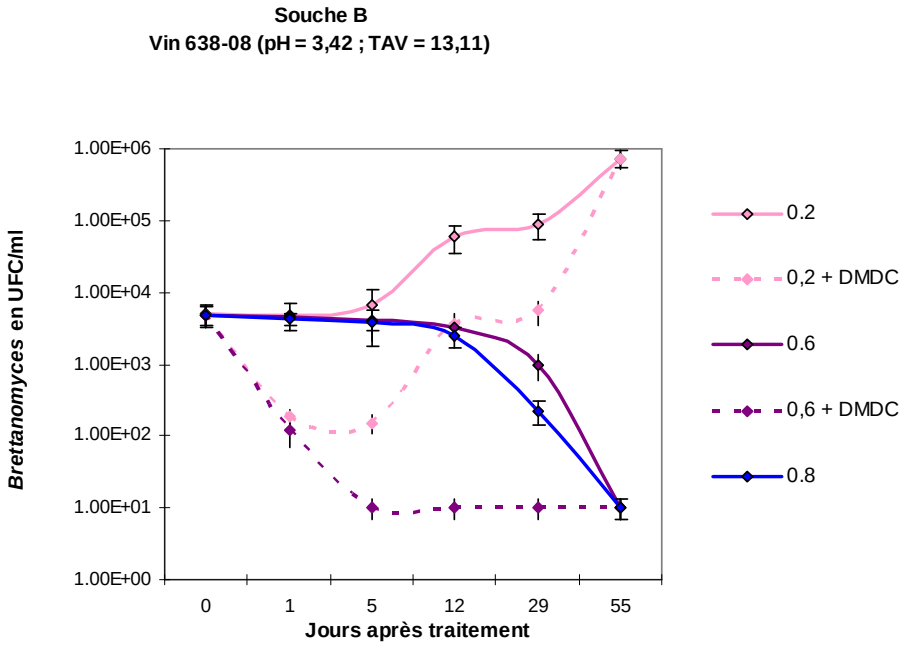


Figure 5 : Impact de la combinaison DMDC/SO_2 sur le développement d'une population de *Brettanomyces* (Souche B) initialement implantée à 5 10^3 UFC/ml sur 1 matrices Merlot -

2. Production de phénols volatils

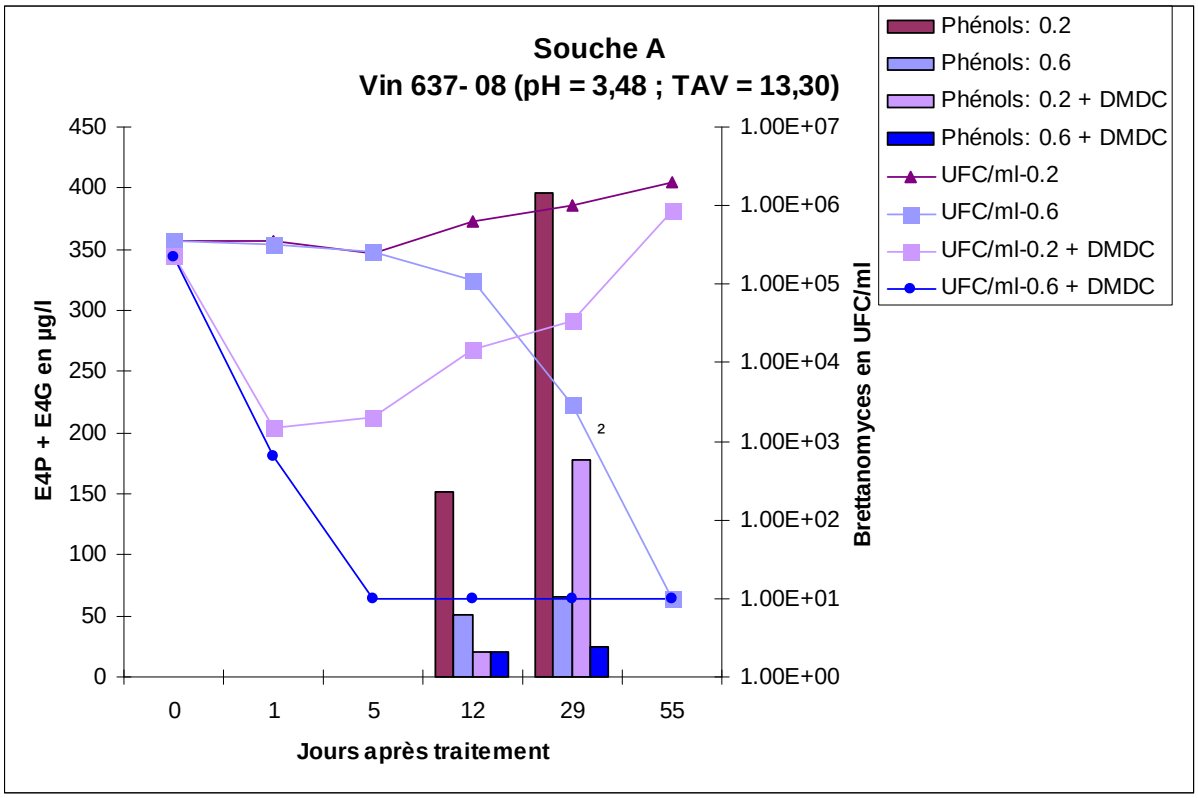


Figure 6 : Evolution des phénols volatils et des niveaux de contamination en *Brettanomyces* en fonction du traitement.

Les suivis de phénols volatils (4éthyl-phénol et 4éthyl-guaïacol) sur le vin 637-08, inoculé avec la souche A mettent en évidence trois phénomènes.

La teneur en phénols volatils est d'autant plus basse que la population contaminante est faible très tôt (Modalité 0.6mg/l de SO_2 actif + DMDC). Ces résultats sont conformes avec de nombreuses publications (Gerbaux et al, 2000, Renouf et al, 2006)

Un maintien de 10^5 UFC/ml *Brettanomyces* pendant moins de 12 jours n'amène pas, sur cette matrice, à la production importante de phénols volatils (somme des 2 < 50 µg / L)

Les modalités SO_2 actif 0.2+DMDC et SO_2 actif 0.6 conduisent à 29 jours à des niveaux comparables de contamination (10^4 UFC/ml), mais avec des cinétiques différentes. La population de la variante SO_2 actif 0.2+ DMDC a connu à ce moment là une longue phase de croissance (28 jours) alors que celle du lot SO_2 actif 0.6 est en phase de décroissance forte après une longue phase stationnaire. Les teneurs en phénols volatils

alors mesurés à 29 jours sont notablement différentes. C'est la modalité qui a connu une longue phase de croissance et pour laquelle le SO_2 actif a été maintenu le plus fort (entre 0.5 et 0.7mg/L contre 0.2mg/L) qui présente la plus faible teneur en phénols volatils (51 µg / L contre 177µg/L), malgré une population globalement plus basse (- 2 log) au cours des 29 jours précédant le contrôle. Deux hypothèses peuvent être émises : 1) la teneur en SO_2 actif semble donc avoir un impact non seulement sur le niveau de population cultivable mais aussi sur le métabolisme des *Brettanomyces*.ou 2) l'état de la population (en croissance vs une phase stationnaire) semble conduire à une activité différente pour ce qui concerne les phénols volatils. Cette dernière hypothèse qui met en avant une plus grande production de phénols volatils en phase de croissance qu'en phase stationnaire est conforme aux résultats de Medawar (2003) mais est en contradiction avec ceux de Salameh (2008).

D. Conclusions et perspectives

Les essais ont été réalisés sur 3 matrices vin et 2 souches de *Brettanomyces*. Ils ont permis de mettre en évidence que pour des contaminations initiales de 5.10^3 UFC / mL, plus de 12 jours étaient nécessaires pour réduire le taux de contamination à moins de 100 UFC/ml par un sulfitage, même à une dose de 0.8 mg/l de SO_2 actif et que ce délai était ramené à plus de 30 jours pour une contamination initiale de 10^5 UFC/ml.

Ces travaux ont aussi montré qu'en présence d'un très faible niveau de SO_2 actif (0.2mg/l) l'ajout de DMDC (200 mg/l) ne permettait pas réduire de façon durable le niveau de contamination en *Brettanomyces*, que ce soit pour des niveaux de contaminations initiaux de 10^5 ou de 10^3 UFC/ml.

Pour des niveaux de contamination supérieurs à 10^3 UFC/ml, en conditions d'élevage, l'emploi de 200mg/l de DMDC seul ne pourra donc pas systématiquement suffire à s'affranchir d'un éventuel problème d'altération des vins par *Brettanomyces*.

Associé à 0.6mg/l de SO_2 actif, le DMDC (200mg/l) permet d'augmenter l'efficacité du SO_2, notamment grâce à un effet "choc" qui conduit dès 5 jours après traitement à atteindre des niveaux de contamination inférieurs à 10 UFC/ml. Dans nos conditions opératoires, plus de 30 jours ont été nécessaires pour atteindre ce résultat avec le SO_2 employé seul. Cet usage conjoint des 2 additifs ne permet que marginalement de réduire les niveaux de phénols volatils produits dès lors que la population viable reste à un niveau suffisant pour donner lieu à une nouvelle phase de croissance dans les vins après traitement.

Ces travaux mettent donc en évidence l'intérêt de l'usage du DMDC en complément du SO_2 dans le cadre de la maîtrise des *Brettanomyces*, dans les situations d'élevage de vins secs, mais soulignent aussi, que pour

des niveaux de contamination élevés (>10^3 UFC/ml), il ne peut être employé seul.

Ces résultats gagneraient à être complétés par une étude permettant, dans la gamme 0.2mg/l à 0.6mg/l de SO_2 actif et pour différents niveaux de contaminations en *Brettanomyces* (compris entre 10 et 1000 UFC/ml), de déterminer plus précisément la synergie SO_2/DMDC afin d'optimiser l'emploi conjoint de ces deux produits.

Remerciements : les auteurs remercient France Agrimer pour son soutien financier.

Bibliographie

Barbe JC., 2000. Essais de mutage à l'aide de Velcorin® en alternative ou complément du dioxyde de soufre, *communication personnelle*

Bertrand et al, 2010. Nouvelles utilisations du DMDC.Partie2 : *Brettanomyces*. www.infowine.com. N. 4/1

Blateyron L. et al, 2008. Carcatérisation génotypique des souches de *Brettanomyces* dans des vins méditerranéens et de la vallée du Rhône. Mise en évidence de l'intérêt du DMDC pour leur élimination dans les vins rouges. Revue Française d'œnologie 230. 1-7

Divol B. *et al*., 2003. Essai d'utilisation du Velcorin® comme agent de mutage des vins liquoreux. *Actes du 7e symposium international d'œnologie*, 462-465.

Bertrand A. Le diméthyldicarbonate (DMDC), un nouvel antiseptique à l'étude en œnologie. Compte rendu de l'OIV, juin 2000, 85-94

Delfini C., Gaia P., Schellino R., Strano M., Pagliarai A. et Ambro S. 2002. Fermentability of Grape Must after inhibition with Dimethyl Dicarbonate. J.Agric.Food Chem. Vol 50, N°20, p5605 à 5611.

Grazietti. A, 2006. Applications œnologiques du dicarbonate de dimethyle. Revue Internet de viticulture et œnologie, 2006, N° 16. www.infowine.com

Medawar W. 2003.Etude physiologique et cinétique de levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte oenologique. Thèse de doctorat de l'Institut polytechnique de Toulouse et de l'université Saint Joseph de Beyrouth

Ough CS, Kunkee RE, Vilas MR, Bordeu E, Huang M-C, 1988. The interaction of sulfur dioxide, pH, and dimethyl dicarbonate on the growth

of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos* MCW. American Journal of Enology and Viticulture 39 279-282.

Salameh D., 2008. Bioconversion de l'acide P-coumarique par *Brettanomyces bruxellensis:* Etude de la cinétique et analyse des étapes réactionnelles. Thèse de doctorat de l'Institut polytechnique de Toulouse et de l'université Saint Joseph de Beyrouth