Paroles D'EXPERT

Note d'informations pratiques

LALLEMAND
LALLEMAND OENOLOGIE

LE BIOCONTRÔLE DES *BRETTANOMYCES* GRÂCE AUX BACTÉRIES ŒNOLOGIQUES SÉLECTIONNÉES

Qu'est-ce que le biocontrôle ?

Le concept de contrôle ou de protection biologique, aussi appelé « biocontrôle », est une méthode connue et appliquée depuis les débuts de l'agriculture. Le développement de l'agriculture a été inéluctablement associé au besoin de protéger les cultures par diverses méthodes. Avec le développement de la chimie appliquée au secteur agroalimentaire, les outils de contrôle biologique ont été délaissés pendant de nombreuses années. Avec une prise de conscience croissante des problèmes environnementaux et sanitaires dûs à l'utilisation des produits chimiques, les méthodes alternatives telles que le biocontrôle ont de nouveau été étudiées avec une connaissance et une approche scientifique plus pointues. Le biocontrôle semble être un excellent moyen naturel de protéger les cultures contre les nuisibles et les maladies.

D'où provient-il ?

Le principe du biocontrôle est basé sur la gestion de l'équilibre des populations nuisibles et non leur éradication. Le biocontrôle encourage l'utlisation d'outils pour favoriser les mécanismes et interactions naturels entre espèces dans un milieu donné.

Dans le secteur alimentaire, le concept de la conservation des aliments par l'intermédiaire d'une flore protectrice a plus de quarante ans. L'objectif a été de prolonger la durée de vie et de limiter les risques de contamination microbiologique : une excellente alternative aux conservateurs alimentaires chimiques. À présent, les applications sur le terrain sont variées et le biocontrôle est utilisé dans l'élaboration du fromage, du pain, des boissons, etc.

Qu'est-ce que cela signifie pour le vin ?

Dans le vin, l'utilisation du SO_2 a marqué une amélioration incroyable de la qualité du produit, principalement grâce à son activité antifongique et antibactérienne. Toutefois, de nos jours, il existe une volonté croissante de réduire les produits chimiques dans la vinification et le SO_2 est évidemment l'un d'entre eux. Il reste un excellent outil pour réduire les populations de microorganismes de contamination tout au long du processus de vinification, tel que la flore levurienne oxidative, les bactéries de contamination et, bien entendu, les *Brettanomyces* qui représentent toujours l'ennemi numéro 1 du vin. Cependant, des études récentes (Curtin *et al*. 2012, Vigentini *et al*. 2013, Albertin *et al*. 2017) ont démontré qu'il existe une grande diversité génétique dans les *Brettanomyces* et que parmi elles, est présent un nombre important de souches de *Brettanomyces bruxellensis* capables de résister et de survivre au SO_2 (figure 1). L'AWRI (Curtin *et al*., 2012) démontre que 85 % de la population des *Brettanomyces* de l'étude a été capable de survivre et de croître à un taux de 0,6 mg/L de SO_2 moléculaire. Albertin *et al*. (en 2016) a identifié 34 % de souches de *B. bruxellensis* dans une collection de 33 souches comme étant extrêmement résistantes au SO_2.

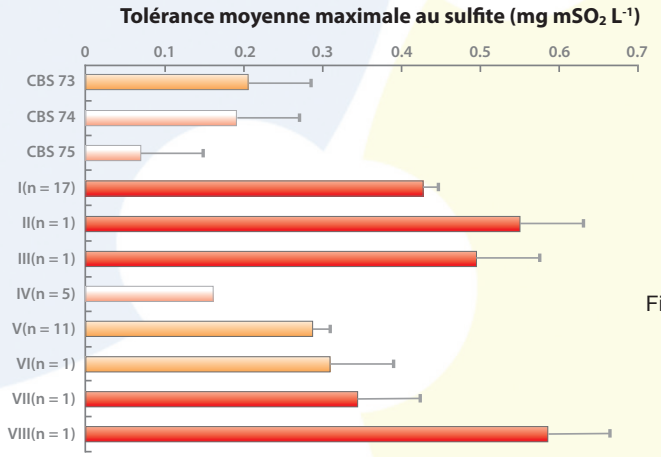

Figure 1. Tolérance au sulfite de divers isolats de *Brettanomyces bruxellensis* australiens (de Curtin *et al*. 2012).

Les bactéries sélectionnées peuvent-elles être utilisées comme biocontrôles ?

Ce type de résistance provoquerait de très hautes teneurs finales en SO_2 dans les vins pour atteindre la teneur létale nécessaire à l'éradication de ces populations de *Brettanomyces*. Ces résultats montrent les limites du SO_2 comme outil de contrôle des *Brettanomyces* et le besoin d'outils alternatifs de biocontrôle pour contourner ce risque. L'inoculation précoce de la levure (Gerbaux *et al*., 2004) est déjà connue comme outil de biocontrôle très efficace contre le développement des *Brettanomyces*. Plus récemment, il a été découvert que certaines bactéries œnologiques méticuleusement sélectionnées peuvent aussi être considérées comme outils de biocontrôle efficaces pour résoudre les problèmes de contamination des *Brettanomyces* et des teneurs en phénols volatils dans le vin. Ces composés chimiques volatils et principalement 4-éthylguaïacol (4-EG) et 4-éthylphénol (4-EP) sont responsables de caractéristiques organoleptiques désagréables dans les vins. La bonne pratique de l'inoculation des bactéries œnologiques sélectionnées est aussi reconnue par l'OIV (RÉSOLUTION OIV-OENO 462-2014) pour réduire le développement des *Brettanomyces* au cours du processus de vinification. Il a aussi été découvert que certaines bactéries œnologiques sélectionnées sont considérées comme des outils de biocontrôle efficaces contre les microorganismes de contamination pour protéger la qualité du vin.

LES RÉSULTATS

BIOCONTRÔLE AVEC DES BACTÉRIES ŒNOLOGIQUES SELECTIONNEES CONTRE LE DÉVELOPPEMENT DES *BRETTANOMYCES*

Des études précédentes ont montré l'impact clair de l'inoculation précoce des bactéries oenologiques sélectionnées sur la réduction des teneurs finales en phénols volatils (Gerbaux *et al*. 2009 ; Pillet *et al*. 2011). Il est connu que la phase de latence à la fin de la fermentation alcoolique et au début de la fermentation malolactique (FML) est critique pour les microorganismes d'altération tels que les bactéries contaminantes et les *Brettanomyces*. En 2014, l'OIV a reconnu que la co-inoculation de levures sélectionnées et de bactéries lactiques sélectionnées pouvait aider à réduire la phase de latence et, ainsi limiter le développement des *Brettanomyces*. Des projets d'études récents ont cherché à savoir si en plus de la réduction de la phase de latence, certaines bactéries sélectionnées pouvaient avoir un effet inhibiteur direct sur le développement des *Brettanomyces*. Les recherches effectuées en collaboration avec l'IFV en Bourgogne en 2015 et 2016 dans du Pinot ont montré la dynamique de la population des microorganismes dans les vins inoculés juste après la fermentation alcoolique avec des *Brettanomyces*, puis avec diverses bactéries sélectionnées (1 g/hL) à une température de 16 et 18°C.

Les résultats démontrent qu'il existe une inhibition claire du développement des *Brettanomyces* grâce aux bactéries sélectionnées, et ce, sur les deux années d'étude ou d'expérimentation. Dans la figure 2, nous pouvons voir les mesures des populations de *Brettanomyces* en 2016 et celles de 3 bactéries différentes sélectionnées comparées à l'essai témoin dans lequel aucune bactérie n'a été inoculée et où la FML se produit spontanément. Les résultats ont été les mêmes lorsque les *Brettanomyces* étaient à 10^3 ufc/ml.

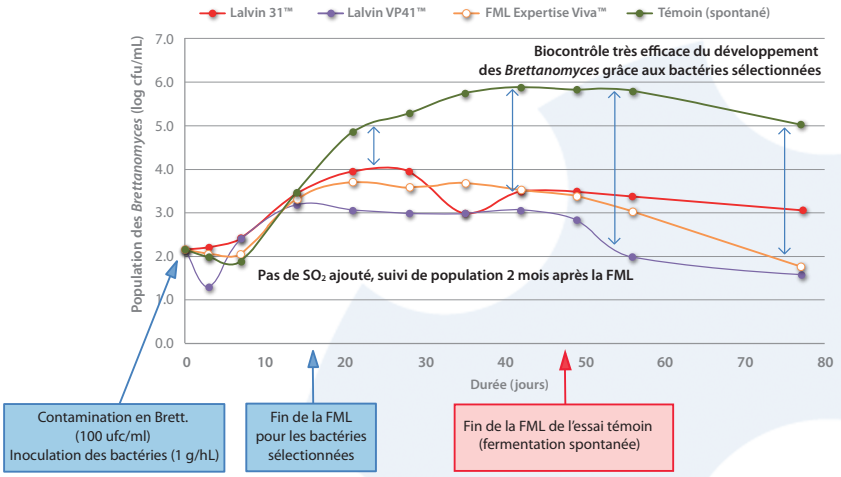

Figure 2. Biocontrôle de la population des *Brettanomyces* par diverses bactéries œnologiques sélectionnées.

L'inoculation et le développement des 3 bactéries sélectionnées limitent grandement le développement des *Brettanomyces*, même si la contamination en *Brettanomyces* était importante au départ. Les taux finaux de *Brettanomyces* en présence des bactéries sélectionnées ont été plus ou moins les mêmes qu'au départ (entre 10^2 et 10^3 ufc/ml), alors que dans l'essai témoin contenant les bactéries indigènes (FML spontanée), le taux final de *Brettanomyces* a été bien supérieur (10^5) avec une pointe à 10^6 ufc/ml, c.-à-d. une différence de plus de 2 à 4 log.

Les phénols volatils ont été mesurés à la fin de l'expérience dans tous les traitements (figure 3) et le vin dans lequel la FML s'est produite spontanément affiche les plus fortes teneurs en 4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol, au-dessus du seuil de perception, alors que les vins dans lesquels des bactéries sélectionnées ont été inoculées ont des teneurs très basses, voir quasiment nulles, des deux types de phénols.

LES RÉSULTATS (suite)

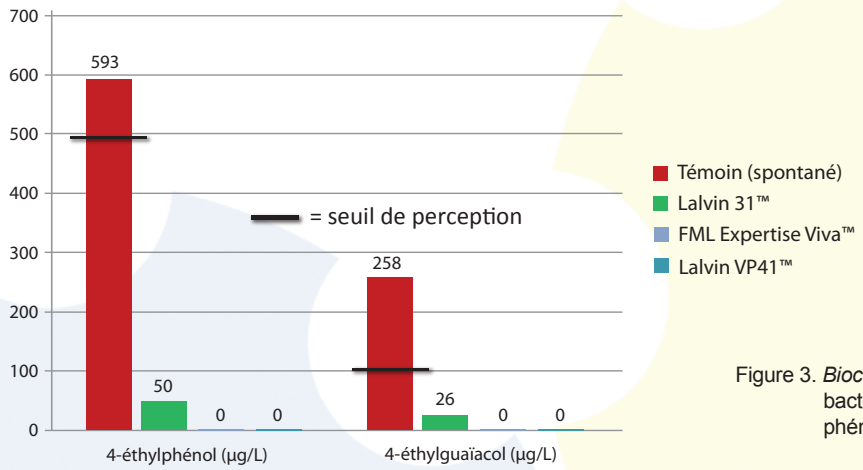

Figure 3. *Biocontrôle des Brettanomyces* par l'inoculation de bactéries sélectionnées. Impact sur la production de phénols volatils

Ces différences en phénols volatils sont clairement associées aux différences de population et démontrent encore une fois l'avantage réel d'un biocontrôle des *Brettanomyces* grâce à l'inoculation de certaines bactéries sélectionnées ainsi que pour la qualité du vin.

Ce résultat a été confirmé par une autre étude menée en 2016 sur Pinot noir. Quatre bactéries sélectionnées ont été utilisées en co-inoculation (24 heures après l'inoculation de la levure) d'un moût initialement contaminé avec 1,7 x 10^3 ufc/ml de *Brettanomyces*. La FML s'est achevée en 20 à 40 jours, alors que le témoin non-inoculé a eu besoin de plus de 60 jours pour y parvenir.

Les figures 4a et 4b illustrent l'évolution des populations de *Brettanomyces* et des bactéries : dans le cas de la co-inoculation d'une bactérie sélectionnée (figure 4a – les résultats montrés forment une moyenne de tous les traitements avec les bactéries sélectionnées) et dans le cas du témoin (figure 4b – fermentation spontanée). Nous pouvons clairement voir dans la figure 4a qu'il n'existe aucun développement de la population des *Brettanomyces* (même avec cette forte contamination) et que la population contaminante décroît du début à la fin à l'inverse de la population de la bactérie sélectionnée qui croît pendant ce temps-là. Par opposition dans la figure 4b, la population en *Brettanomyces* se maintient à un niveau important jusqu'au 11e jour (date du soutirage) et se développe à nouveau par la suite, dû au ralentissement du développement de la population des bactéries indigènes. Les taux finaux sont extrêmement différents entre les vins en co-inoculation et l'essai témoin : il y a 10 fois plus de *Brettanomyces* dans le témoin que dans les vins inoculés concomitamment (plus d'un log ufc/mL de différence). Ces résultats confirment la forte concurrence entre nos bactéries sélectionnées et une population contaminante de levure telle que les *Brettanomyces*, particulièrement en co-inoculation grâce à un développement plus facile des bactéries sélectionnées et une excellente capacité de survie de ces bactéries.

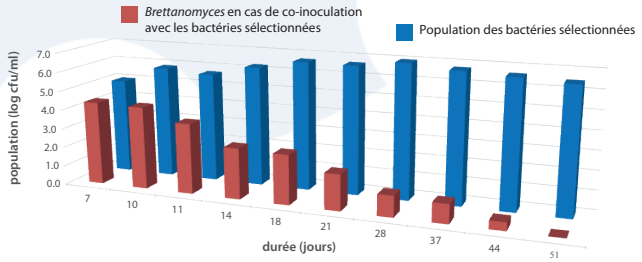

Figure 4a. *Suivi des populations de Brettanomyces* et de bactéries. Co-inoculation avec des bactéries sélectionnées.

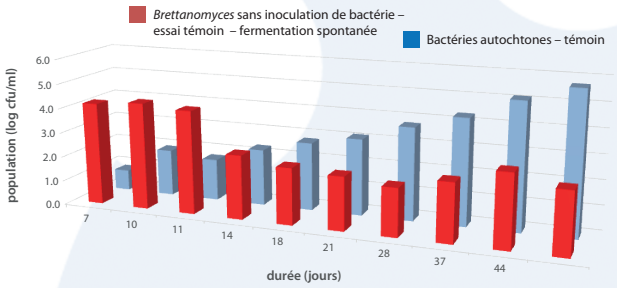

Figure 4b. *Suivi des populations de Brettanomyces* et de bactéries. Témoin sans inoculation de bactéries.

CONTRÔLE DES PRÉCURSEURS DES PHENOLS VOLATILES PAR LES BACTÉRIES OENOLOGIQUES

Avec les *Brettanomyces*, du 4-éthylguaïacol (4-EG) et du 4-éthylphénol (4-EP) sont produits pendant la biotransformation des acides hydroxycinnamiques (acide p-coumarique et acide férulique), qui sont des précurseurs naturellement présents dans le raisin sous forme liée ou libre. La transformation de ces précurseurs libres en 4-EG et 4-EP (figure 5) se produit en deux étapes : d'abord avec l'enzyme cinnamate décarboxylase, puis par l'enzyme vinylphénol réductase. Toutefois, avant que les B*rettanomyces* puissent utiliser ces précurseurs, ils doivent être convertis de leur forme liée à leur forme libre grâce à l'action de l'enzyme cinnamyl estérase.

LES RÉSULTATS (suite)

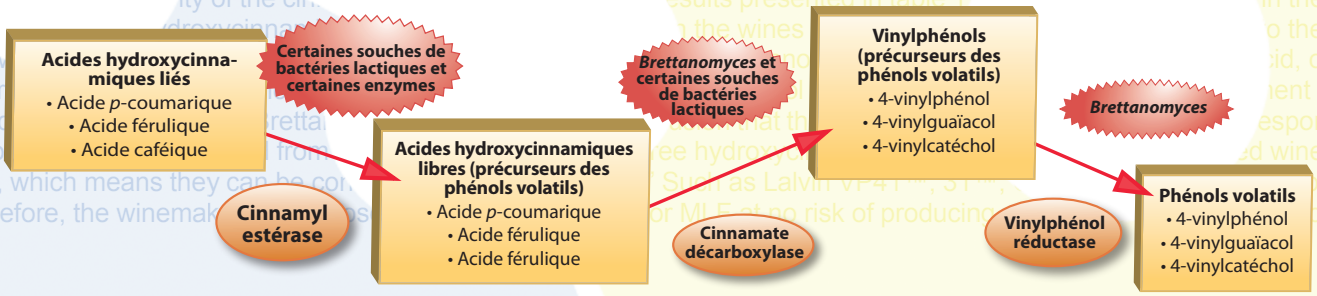

Figure 5. Voie de synthèse des éthylphénols

Certaines bactéries lactiques, y compris *Oenococcus oeni*, ont cette activité enzymatique cinnamyl estérase et peuvent donc augmenter la quantité de précurseurs libres, rendus utilisables par les *Brettanomyces* pour produire des phénols volatils (Burns et Osborne, 2013). Leurs résultats montrent qu'en fonction des bactéries œnologiques utilisées pour la FML, différentes concentrations de précurseurs libres sont produites.

Ceci signifie que lors de l'utilisation d'une bactérie œnologique, elle doit être *cinnamyl estérase négative* afin d'éviter la production de précurseurs de phénols volatils qui seraient utilisés par les *Brettanomyces*.

Toutes nos bactéries œnologiques ont été testées et nous pouvons affirmer qu'elles sont toutes "phénol-négatives" comme montré dans la figure 6, extraite d'une étude réalisée par J. Osborne (OSU).

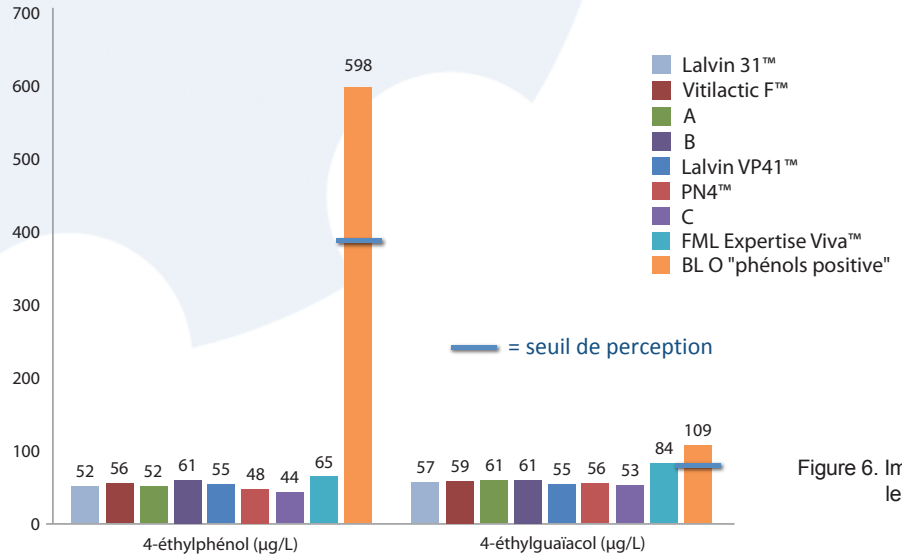

Figure 6. Impact sur la production de phénols volatils selon les bactéries sélectionnées inoculées.

EN RÉSUMÉ

Le biocontrôle des microorganismes de contamination grâce à certaines bactéries œnologiques sélectionnées est une option sécurisée et biologique pour les vinificateurs. En gérant minutieusement la fermentation alcoolique avec une levure correctement réhydratée et nourrie, et en utilisant une bactérie œnologique sélectionnée en co-inoculation ou en inoculation séquentielle, la population des *Brettanomyces*, et donc la production de caractéristiques organoleptiques désagréables qui en résulte, sont mieux contrôlées. Lorsque le niveau de contamination des *Brettanomyces* est élevé, la co-inoculation est plus appropriée, car le biocontrôle commencera immédiatement au début de la fermentation.

De plus, nos bactéries œnologiques sélectionnées ont été confirmées comme étant phénol-négatives et elles ne peuvent donc pas fournir aux *Brettanomyces* les précurseurs pour produire des caractéristiques organoleptiques désagréables, du 4-éthylphénol et du 4-éthylguaïacol.

Le biocontrôle grâce à la protection de nos bactéries œnologiques sélectionnées, associé à la non production de précurseurs de *Brettanoymces* constituent une combinaison gagnante pour respecter la typicité du vin en le laissant s'exprimer pleinement sans les défauts de « Brett ».

LALLEMAND

Paroles D'EXPERT

LE MOT DE L'EXPERT

Vincent Gerbaux

En 1982, Vincent a obtenu une maîtrise en biologie appliquée à la nutrition et aux aliments de l'Ensbana (maintenant AgroSup Dijon), et en 1983 un diplôme national d'œnologie. Il a étudié les bactéries lactiques pendant sa thèse à l'Université de Dijon (1983 à 1985). En 1985, il a commencé à travailler pour l'IFV à Bordeaux, puis il a rejoint l'IFV à Beaune trois ans plus tard.

Vincent est responsable du projet « Technoferm » de l'IFV, rassemblant toutes les études sur les fermentations alcooliques et malolactiques. Collaborant avec Lallemand depuis de nombreuses années, il a sélectionné et caractérisé des souches originales d'*Oenococcus oeni* disponibles dans le commerce. Il gère aussi une étude sur 5 ans sur la sélection de souches *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* pour des applications technologiques spécifiques. En parallèle, l'équipe travaille aussi sur les microorganismes de contamination dans le vin, particulièrement les *Brettanomyces*.

Les levures *Brettanomyces* ont toujours été associées au vin. Un poème écrit pendant la Première Guerre mondiale (Marc Leclerc, 1915) dit : « …Salut ! Pinard de l'intendance, Qu'as d'trop peu ou goût de rien, sauf les jours où t'aurais tendance À puer l'phénol ou bien l'purin… ». Mais l'implication des *Brettanomyces* dans la production de phénols volatils dans les vins et la reconnaissance de ce phénomène comme un problème ne date que des années 1980. Les dernières recherches réduisent le seuil de perception des phénols volatils à environ 200 µg/L, une valeur facilement atteinte en cas de contamination par des *Brettanomyces*. Cette levure possède une capacité remarquable à s'adapter à des conditions physico-chimiques défavorables. Les *Brettanomyces* peuvent se multiplier à la fois pendant la macération, en présence de sucres et dans les bouteilles après plusieurs années de stockage des vins secs ayant fini leur fermentation. Diverses études montrent que les chais contiennent une grande biodiversité de *Brettanomyces*.

La meilleure stratégie de contrôle des *Brettanomyces* implique une bonne hygiène, l'utilisation d'un contrôle microbiologique et le contrôle des fermentations. Le contrôle de la fermentation malolactique est un point crucial de cette lutte. L'inoculation de bactéries œnologiques sélectionnées apporte diverses solutions de contrôle de la FML. En fonction de l'âge du site et du risque de production de phénols volatils, la FML peut être très rapide lorsque menée par co-inoculation de levure et de bactéries ou lente avec un ensemencement en bactéries tardif associé à une basse température. Ces diverses options doivent permettre l'achèvement de la FML avant d'observer un développement problématique des *Brettanomyces*. Il est alors possible de stabiliser le vin avec un sulfitage conventionnel ou en utilisant un composé alternatif ou complémentaire, le chitosane. Après la FML, le développement des *Brettanomyces*, bien que se poursuivant toujours, est bien moins rapide et bien moins important que ce qu'il était avant la FML. L'induction de la FML par inoculation apporte une énorme population de bactéries œnologiques qui exerce un effet direct négatif sur le développement des *Brettanomyces*.

POUR NOUS CONTACTER

Lallemand France/Suisse/Chine
Lallemand SAS
fb.france@lallemand.com
Tél : +33.5.62.74.55.55

Lallemand Italie
fb.italia@lallemand.com
Tél : +39 (0) 45 51 25 55

Lallemand Péninsule Ibérique
wine@lallemand.com
Tél : (+34) 91 4415053

Lallemand Scandinavie et Royaume-Uni
sigrid@lallemand.com
Tel: +45 5357 2280

Lallemand Allemagne, Autriche, Grèce, Hongrie, Israël, Chypre, Malte, Pologne
fb.eurocenter@lallemand.com
kburger@lallemand.com
Tél/Téléc : (+43) 27 35 80 147

Ferment Croatie, Slovénie, Macédoine, Roumanie, Russie, Serbie, Moldavie, Ukraine
nmaslek@lallemand.com
Tél : (+385) 98 30 24 62

Lallemand Amérique du Nord, Mexique, Japon, Taïwan
gspecht@lallemand.com

Lallferm S.A. Chili, Argentine, Uruguay, Brésil, Équateur, Colombie
pcarriles@lallemand.com
Tél : +54 (261) 425 67 89

Lallemand Australie , Nouvelle Zélande
australiaoffice@lallemand.com
Tel: +61 (8) 8276 1200

Lallemand Afrique du Sud
ploubser@lallemand.com
Tél : +27 21 913 7555

Available on the App Store

LALLEMAND
LALLEMAND OENOLOGIE