

Vins biologiques : biodiversité et nutrition de la levure

52

RÉSUMÉ La vinification des vins bio restreint l'usage de certains produits de traitement des vignes et des vins. Cette restriction, dont le but est de produire de manière plus intégrée à l'environnement, n'est pas censée affecter la qualité des produits. C'est pour valider scientifiquement ce postulat technique, que des programmes d'expérimentation ont été menés ces dernières années.

Cet article fait la synthèse de deux programmes distincts, dont les objectifs étaient d'une part d'évaluer la biodiversité de la microflore indigène des raisins, et d'autre part de tester l'impact des ajouts d'azote durant la vinification. Le protocole expérimental mis en place proposait de comparer les pratiques dites conventionnelles aux pratiques du cahier des charges bio.

Les résultats n'ont pas montré de différence entre un itinéraire conventionnel et un itinéraire bio. A la lumière des outils d'analyse mis en œuvre, les restrictions du cahier des charges bio n'ont pas d'impact spécifique.

MOTS CLÉS

BIO, LEVURES, NUTRITION, ITINÉRAIRE
CONVENTIONNEL, AZOTE, FERMENTATION

ABSTRACT The winemaking of Organic wines restricts the use of certain vineyards and wines treatments. This restriction, which aims to produce in respect of the environment, is not intended to affect the quality of products. This is to scientifically validate this technical assumption, that experimental programs have been conducted in recent years.

This article summarizes two separate programs, whose objectives were firstly to assess the biodiversity of the indigenous microflora of grapes, and secondly to test the impact of nitrogen additions during winemaking. The experimental protocol intends to compare the so-called conventional practices to the Organic specifications.

The results showed no difference between a conventional route and Organic route. In the light of analysis tools implemented, the restrictions of the Organic specifications do not have a specific impact.

KEYWORDS

ORGANIC, YEASTS, NUTRITION, NITROGEN,
ALCOHOLIC FERMENTATION

Nicolas RICHARD
Virginie SERPAGGI
Laurent MASSINI
Patrick VUCHOT
Inter Rhône
Service technique
2260, rte du Grès
84100 Orange
nrichard@inter-rhone.com
04 90 11 46 52



Nicolas RICHARD

Organic wines : yeast's biodiversity and nutrition



La biodiversité est un enjeu particulièrement important en œnologie. La variété des micro-organismes permet au vigneron d'ajouter une palette importante d'arômes à des raisins déjà marqués par leur terroir. La culture biologique des raisins tend à limiter les traitements phytosanitaires et leur impact sur la microflore, pour un meilleur respect de cette flore naturellement présente. Celle-ci est souvent perçue comme spécifique d'un domaine ou d'une propriété et donc comme un gage pour se différencier, dans un marché du vin mondialisé. Il est donc intéressant de vérifier l'impact de la culture biologique sur la biodiversité levurienne.

Les vinificateurs engagés dans une telle démarche cherchent également à évaluer l'impact réel des pratiques restreintes du cahier des charges de vinification biologique sur la qualité des vins, et en particulier sur leur fermentescibilité. Le volet levures et nutrition des levures leur pose de nou-

velles questions : les levures certifiées bio sont-elles différentes des non-certifiées ; les spécialités d'azote organique fonctionnent-elles comme l'azote minéral ?

BIODIVERSITÉ DES SOUCHES DE LEVURES

Les flores présentes avant la fermentation alcoolique sont très variées. Si des micro-organismes d'intérêt sont présents, tels que les levures du genre *Saccharomyces* ou les bactéries lactiques, d'autres types de micro-organismes, potentiellement néfastes, font également partie de cette microflore : levures oxydatives, levures du genre *Brettanomyces*, bactéries acétiques, moisissures...

Les dynamiques de population durant ces stades sont complexes. Par exemple, il est reconnu qu'une croissance précoce de levures du genre *Brettanomyces* peut aboutir, outre à la production de phénols volatils, à une fermentation languissante, voire à un arrêt de fermentation alcoolique, par concurrence des populations de *Saccharomyces cerevisiae* (Vincent *et al.*, 2006). Un autre

Itinéraires	Cépage	Date conversion	Commentaire
Bio	Syrah	1997	Biodynamie depuis 2010
Bio	Grenache	2008	Biodynamie depuis 2008
Bio	Clairette	1997	Biodynamie depuis 2010
Bio	Clairette	2008	Biodynamie depuis 2008
Conventionnel	Syrah	-	Pas insecticide ou herbicide depuis 2009
Conventionnel	Grenache	-	Dernier traitement août
Conventionnel	Clairette	-	Dernier traitement juillet
Conventionnel	Clairette	-	Dernier traitement août

tableau 1

Liste et caractéristiques des parcelles concernées par le prélèvement.

exemple est la synthèse d'acétate d'éthyle par les levures ayant un métabolisme oxydatif. Cette production apparaît fréquemment durant les phases pré-fermentaires notamment dans les cas de macération pré-fermentaire à froid (Murat *et al.*, 2008).

Beaucoup de problèmes de fermentation ou de conservation trouvent leur origine dans ces phases pré-fermentaires et fermentaires. La biodiversité lors de cette étape de la vie du vin est mal connue, Inter Rhône propose de comparer des parcelles bio à des parcelles à itinéraires conventionnels. L'objectif sera d'étudier la biodiversité respective de ces deux modalités et d'évaluer l'impact du système de production sur la prévalence de souches levuriennes responsables de déviations potentielles dans le vin.

• Mode opératoire

Un état des lieux des flores levuriennes présentes sur raisin a été réalisé sur deux années consécutives, afin d'étudier la biodiversité, avant fermentation alcoolique et développement massif de *Saccharomyces cerevisiae*.

Huit parcelles ont été sélectionnées pour cet essai : quatre en cépage rouge et quatre en cépage

blanc (tabl. 1). Six grappes ont été prélevées par parcelle en trois points de prélèvement, distants autant que possible les uns des autres (bord de la parcelle et deux points plus en profondeur). Ces grappes ont été réparties dans des sacs stériles et l'écrasement a été limité.

Les parcelles en agriculture biologique sont passées à ce mode de culture depuis un grand nombre d'années pour les premières (1997) et plus récemment pour les secondes (2008). Dans tous les cas, il ne s'agit pas d'une évolution récente des pratiques culturales.

Les raisins prélevés en sacs stériles sont ensuite broyés (pour se rapprocher au plus des conditions de début de fermentation alcoolique) puis le jus recueilli est mis en culture. Au total, 20 souches de levures sont prélevées par parcelles pour un total de 160 souches.

L'ensemble de cet essai a été conduit sur deux années consécutives, à savoir 2011 et 2012. Les prélèvements ont été réalisés dans les tous premiers jours de septembre, à maturité, juste avant récolte.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Au total, chaque année de prélèvement, 160 souches ont été isolées, purifiées puis mises en collection (tabl. 2). Parmi les souches isolées la première année, 8 ont été perdues au fur et à mesure des repiquages. Aucune n'a été perdue la seconde année.

Il est important de noter qu'aucune des conditions de couleur, de type de culture, de matière première ou de millésime n'influence la présence des souches et leur répartition. Les mêmes souches et les mêmes proportions sont isolées, que les parcelles aient été cultivées en agriculture biologique ou conventionnelle.

Quelques profils n'ont pu être déterminés, aucune identification n'a été définie. L'espèce majoritaire est *Aureobasidium pullulans*, avec 67% des isolements la première année et 93% la seconde année. Il s'agit d'un micro-organisme, classé tantôt parmi les levures, tantôt parmi les moisissures. Il est fréquemment isolé dans le sol, sur les plantes, voire l'air. Cette levure n'a pas d'impact sur le moût puis le vin, dans lesquels il ne se développe pas. Elle reste toutefois très pré-

Résultats des identifications de souches de levures et nombre de souches prélevées selon l'itinéraire bio ou conventionnel.

tableau 2	Année 1		Année 2	
	bio	conventionnel	bio	conventionnel
<i>Aureobasidium pullulans</i>	50	57	76	72
<i>Candida pyralidae</i>	0	0	0	2
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	0	0	1	0
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	0	0	0	1
Profil inconnu	12	15	3	5
<i>Kloeckera apiculata ou apis</i>	13	3	0	0
<i>Candida stellata</i>	4	0	0	0
<i>Rhodotorula graminis</i>	0	5	0	0
<i>Pichia spp</i>	1	0	0	0
TOTAL	160		160	



sente à ce stade, et ce constat est généralisé: lors d'études menées sur les sols français et australien, cette levure était identifiée majoritairement sur raisins (Diguta, 2010).

Quelques autres genres-espèces sont retrouvés parmi ces souches isolées, mais il est important de noter que les espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Brettanomyces intermedius* ne sont jamais retrouvées à ce stade. D'autres études, dans des vignobles français et étrangers ont souligné cette même absence de ces deux espèces (Diguta, 2010). La présence de ces espèces est probablement tellement faible qu'il aurait fallu prélever de plus grandes quantités de raisins pour éventuellement les détecter.

Si le fait de travailler en bio ou en conventionnel ne semble pas impacter sur la biodiversité levurienne, il convient de vérifier si le type de produits employés peut influencer la microflore ainsi que les caractéristiques du produit final.

APPLICATION DES CRITÈRES DE VINIFICATION BIOLOGIQUE AUX MOÛTS CARENCÉS EN AZOTE: IMPACT SUR L'ACTIVITÉ LEVURIENNE

Le but de cette série d'expérimentations était d'étudier l'intérêt des spécialités d'azote organique certifiées bio, disponibles sur le marché. Leur impact a été évalué sur des moûts plus ou moins carencés en azote assimilable, afin de tester les limites de ces produits et de diffuser aux vignerons leurs conditions optimales d'utilisation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Six moûts de carences azotées différentes ont servi de support à cette expérimentation. Ces six moûts ont été vinifiés en mini-vinification (70 L) ou en micro-vinification (400mL), à une température classique de 25°C en moyenne.

Deux spécialités commerciales d'azote organique (issu de levures inactivées ou d'autolysats de levures) ont été retenues: Fermaid O (Orga1) et Vitaferm (Orga2). Elles ont été comparées à l'azote minéral le plus couramment utilisé, le phosphate diammonique (DAP).

Les apports azotés ont été réalisés, soit en début de fermentation (perte de 5 points de densité),

Dosage d'éthanal total en fin de FA

matrice carence forte	éthanal total (mg/L)
carencé = témoin	12,90
DAP -30	6,20
DAP -5/-30	15,40
Orga1 -30	9,30
Orga1 -5/-30	11,80
Orga1 + DAP -30	4,40
Orga1 + DAP -5/-30	15,50
Orga1 + DAP -5 puis -30	24,50
Orga2 -30	6,20
Orga2 + DAP -5/-30	10,50
20°C DAP -5/-30	13,20
17 % DAP -5/-30	18,00
20°C Orga1 -5/-30	12,50
17 % Orga1 -5/-30	22,60

tableau 3

soit en phase exponentielle (moins 30 points). Sur certaines modalités, l'apport a été réalisé à ces deux stades, en divisant les doses ajoutées par deux à chaque stade, ou en ajoutant d'abord un produit puis l'autre dans le cas d'un apport mixte (fig. 1).

Les doses d'azote à ajouter ont été calculées selon la procédure suivante:

- DAP seul: apport visant la complémentation en azote assimilable.
 - Organique seul: apport à 40 g/hL max (dose maximale autorisée).
 - Apport mixte organique à 40 g/hL + DAP: visant la complémentation en azote assimilable.
- Le moût a été jugé suffisamment complétement en azote assimilable lorsque la dose cible de 150mg/L est atteinte, pour un degré d'alcool potentiel de 12% + 30mg/L par degré supplémentaire.
- Pour le DAP: 40 g/hL apportent 93 mg/L.
 - Pour un azote organique: 40 g/hL apportent 17mg/L.

Le dosage de l'éthanal libre et total a été réalisé avant le sulfitage de fin de fermentation. Les acides aminés et les composés aromatiques (esters et alcools supérieurs) ont été analysés en toute fin de fermentation, après sulfitage.

Pour comparer la vitalité cellulaire au cours d'une fermentation en moût normal ou en moût carencé, deux modalités ont été mises en place, à partir du même moût que celui utilisé pour l'étude sur les nutriments azotés. Ces deux modalités sont:

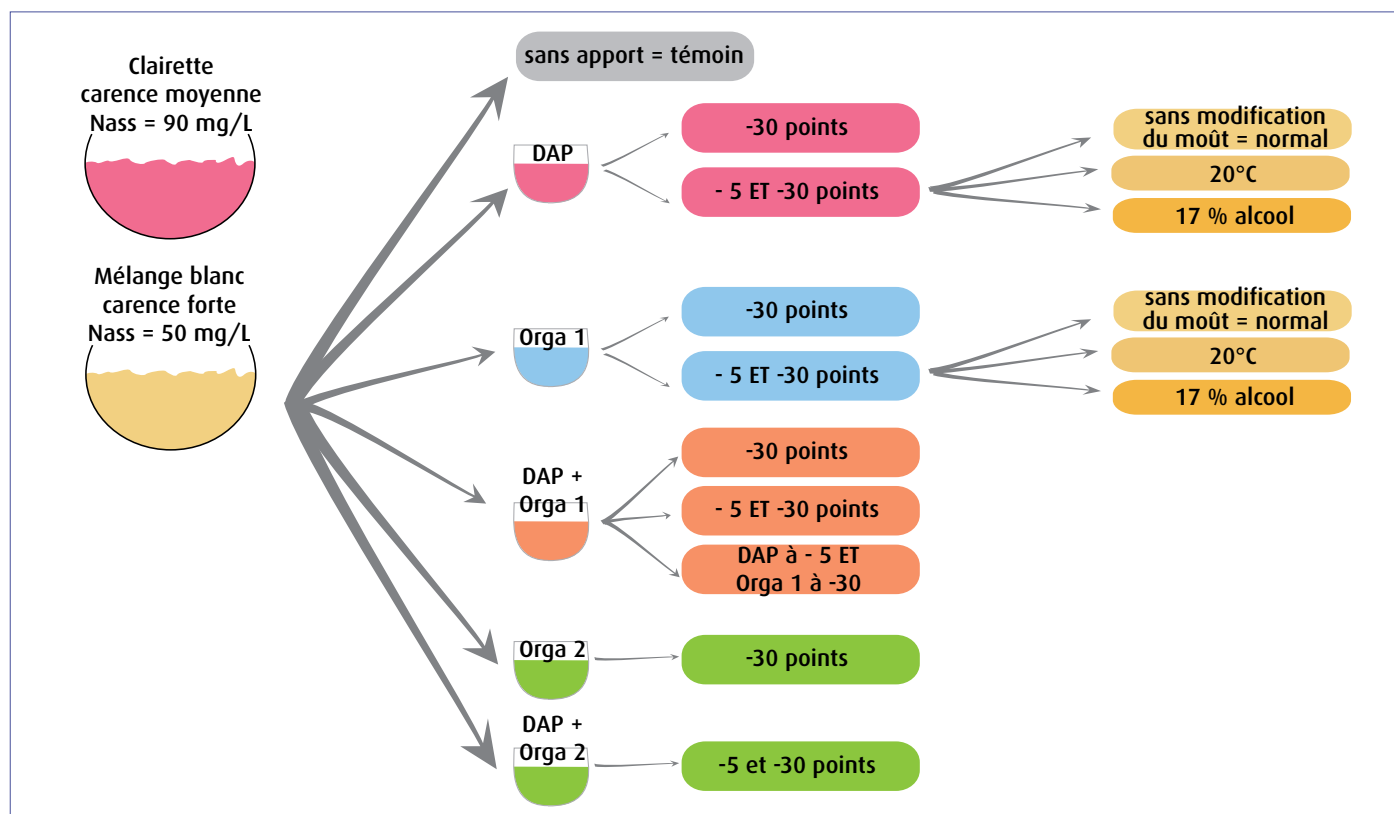


figure 1

Protocole des ajouts d'azote.

- Modalité carencée en azote (témoin) : la modalité moût carencé non supplémenté et fermenté à 28°C est utilisée pour le suivi des populations de levures au cours de la FA.

- Modalité non carencée : le même moût carencé est utilisé, mais avec une supplémentation initiale en azote, pour revenir à un taux de 200 mg/L d'azote assimilable. On obtient donc une modalité sans condition de stress.

Afin de suivre les populations de levures au cours de la FA, un marquage métabolique fluorescent est nécessaire. Le kit Levin (Metis Biotechnologies) est utilisé. Ce kit contient deux fluorochromes qui permettent de déterminer le nombre de cellules vivantes dans l'échantillon, et également de mesurer l'activité enzymatique parmi ces levures vivantes. A l'aide d'un cytomètre en flux FacsVerse (Benton Dickinson), le nombre de cellules vivantes et de cellules actives métaboliquement est mesuré. Pour cela, 100µL de moût en fermentation est prélevé après homogénéisation et marqué selon le protocole délivré avec le kit. Le temps de marquage est de 20 minutes et la lecture est réalisée immédiatement après par cytométrie en flux.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les analyses œnologiques classiques ne révèlent aucune différence entre les modalités de nutrition azotée, quel que soit le niveau de carence de départ.

Au contraire, l'analyse des teneurs en acides aminés en fin de fermentation révèle un effet de l'ajout de nutriments azotés : tout ajout d'azote augmente la teneur finale. L'ajout de DAP augmente cette teneur en acides aminés dans le vin fini de manière plus importante que les préparations d'azote organique. Mais pas tant que l'ajout mixte DAP + organique, qui induit la teneur finale la plus importante. On observe donc que plus il y a d'azote assimilable dans le moût, plus la fermentation est rapide, et plus il reste de matière azotée à la fin.

L'éthanal est produit par les levures dont le métabolisme est ralenti, c'est donc à ce titre un marqueur exploitable pour caractériser a posteriori la cinétique fermentaire. Ici, les teneurs en éthanal libre et total n'ont pas révélé les différences de cinétique dues aux différents apports



azotés (tabl.3). Cependant, nous avons pu observer un effet du moment de l'apport : systématiquement, un apport tardif, après une perte approximative de 30 points de densité, induit une plus faible teneur en éthanal total. On sait qu'un apport trop précoce favorise le développement des levures, tandis qu'un apport tardif (en milieu de phase exponentielle de perte de densité) favorise leur activité (Sablayrolles, Salmon, 2009). Il est donc envisageable qu'un apport trop précoce soit néfaste au métabolisme global de la levure, et l'amène à produire de l'éthanal.

L'étude des composés aromatiques issus de la fermentation a été menée sur une des matrices. Il en ressort que l'impact sur ces composés aromatiques est quasiment négligeable. La somme des esters et des alcools supérieurs est très légèrement augmentée par l'ajout mixte DAP + Orga2, mais il est peu probable que cela puisse avoir un réel impact organoleptique sur le produit final.

• Suivi de la cinétique fermentaire

Conformément à ce qui était attendu, le DAP a augmenté la vitesse maximale de fermentation, ce qui a diminué la durée de fermentation alcoolique (FA) de plusieurs jours (fig. 2). Les spécialités d'azote organique testées ont également eu un effet accélérateur de la fermentation, mais cet effet est systématiquement moindre que celui du DAP. Cette différence entre azote minéral et organique a été observée quel que soit le niveau de carence initiale, et se retrouve sur la matrice alcoolisée à 17% et sur la fermentation effectuée à basse température. Il est cependant important de noter qu'au-delà des qualités différentes d'azote (minéral ou organique), la teneur en azote assimilable était toujours plus importante pour le DAP que pour les modalités Azote organique (cf Matériel et méthodes). On peut donc penser que le DAP a plus d'effet sur la cinétique que les spécialités organiques, quelles que soient les conditions de fermentation.

Dans nos expérimentations, l'Orga2 accélère plus la cinétique fermentaire que l'Orga1, mais ceci reste à démontrer sur un nombre important de matrices. Sur les fortes carences, l'Orga1 n'accélère que très peu la fermentation. Le produit Orga2 a tout de même quasiment égalé l'effet du DAP sur l'une des six matrices.

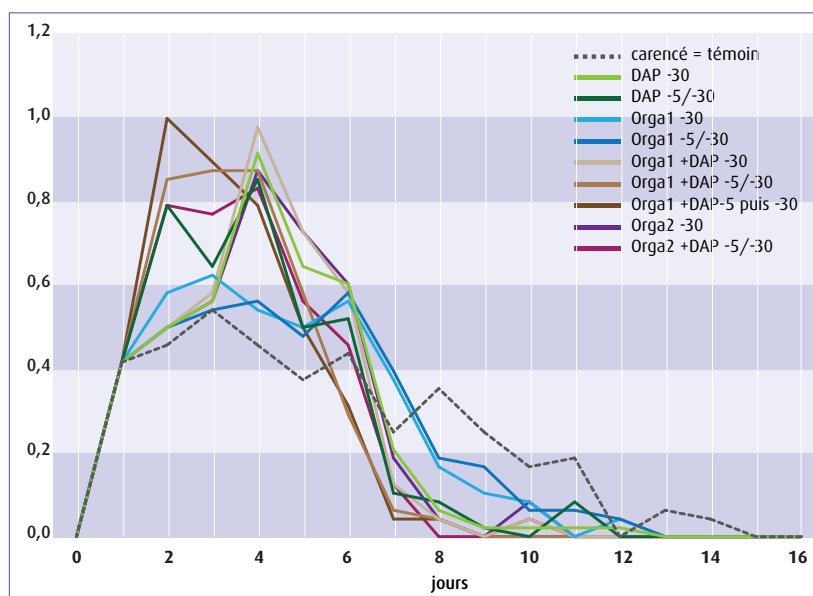


figure 2

Vitesse de FA en perte de densité par heure.

L'effet d'un apport mixte, c'est-à-dire un ajout d'azote organique complété par un ajout de DAP (inférieur à l'ajout de DAP seul), permet d'égaliser l'effet accélérateur du DAP seul, voire de le dépasser très légèrement dans nos expérimentations. Les deux formes d'azote se complètent, ce qui représente une alternative intéressante sur les carences fortes, pour les vignerons dont le souhait est de réduire les doses de DAP.

La modification UE 1251/2013 du règlement européen ne limitera plus les doses d'azote organique (levures inactivées et autolysats), puisque la limite maximale de 40 g/hL a été supprimée pour les levures inactivées et les autolysats de levures

Evolution des populations de levures en cours de FA dans le moût complément en azote.

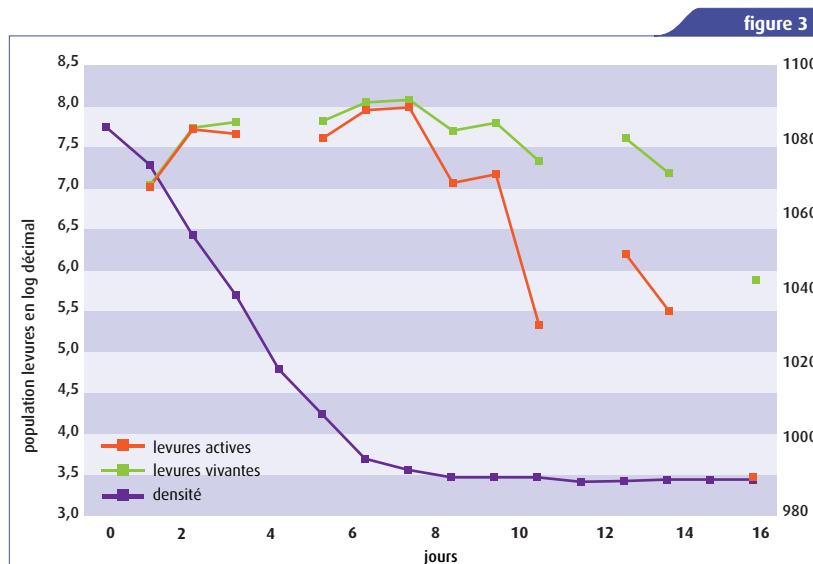


figure 3

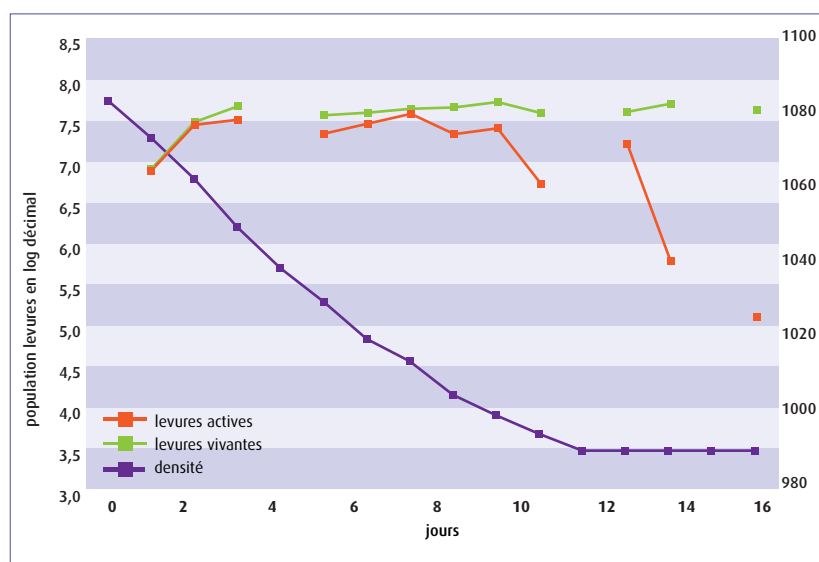


figure 4

Evolution des populations de levures en cours de FA dans un moût carencé en azote.

tels que ceux testés dans nos essais. Concernant la production de vin bio, la réglementation évolue et il est intéressant de produire des résultats sur la faisabilité d'un apport organique seul sur les fortes carences, que ce soit avec des levures inactivées ou des autolysats.

• Evaluation de la vitalité des levures

En complément de l'étude de la cinétique fermentaire, un suivi des populations et de leur activité enzymatique a été réalisé grâce à la cytométrie en flux, sur les moûts très carencés. La technologie de cytométrie en flux permet de suivre l'état physiologique et le nombre de levures dans le moût. A l'aide de marqueurs fluorescents ciblant une activité enzymatique, il est possible de compter en quelques secondes le nombre de levures vivantes présentes dans le moût. L'intensité de ce marquage fluorescent indique également l'activité métabolique des levures.

Ainsi, les changements métaboliques durant la fermentation dans deux modalités différentes ont pu être observés : modalité témoin et modalité carencée en azote.

Dans la modalité complétement en azote (moût carencé complétement en DAP), on observe une population de levures qui dès le début de la FA atteint rapidement 10^8 cellules/mL de moût (figure 3). Cette population de levures très actives se maintient jusqu'au 7e jour de la FA, c'est-à-dire jusqu'à la fin de l'utilisation des

sucres. Ensuite, on voit que l'activité des levures chute rapidement, en lien avec le nombre de cellules vivantes. A la fin du suivi, la population vivante est de 10^6 cellules/mL et seulement de 5.10^3 cellules actives/mL.

Pour le cas du moût carencé non complétement en azote (fig. 4), la FA se déroule plus lentement avec une densité qui atteint 0,990 au bout de 11 jours au lieu de 8 jours pour le cas supplémenté en azote (fig. 3). La FA est donc plus difficile à réaliser. Ceci se traduit par un nombre de cellules vivantes plus faible pour cette condition carencée. La population ne dépasse pas 5.10^7 cellules vivantes/mL. En revanche, l'activité métabolique des levures est tout aussi bonne en cas de carence qu'en cas de moût suffisamment azoté. Mais cette activité commence à chuter avant que les sucres ne soient complètement consommés. Et 5 jours après la fin de la FA (ici au jour 15), la population active est de 10^5 cellules/mL. Alors que dans la modalité témoin, 5 jours après la fin de la FA (jour 12) la population avec une forte activité métabolique est encore de plus de 10^6 cellules/mL.

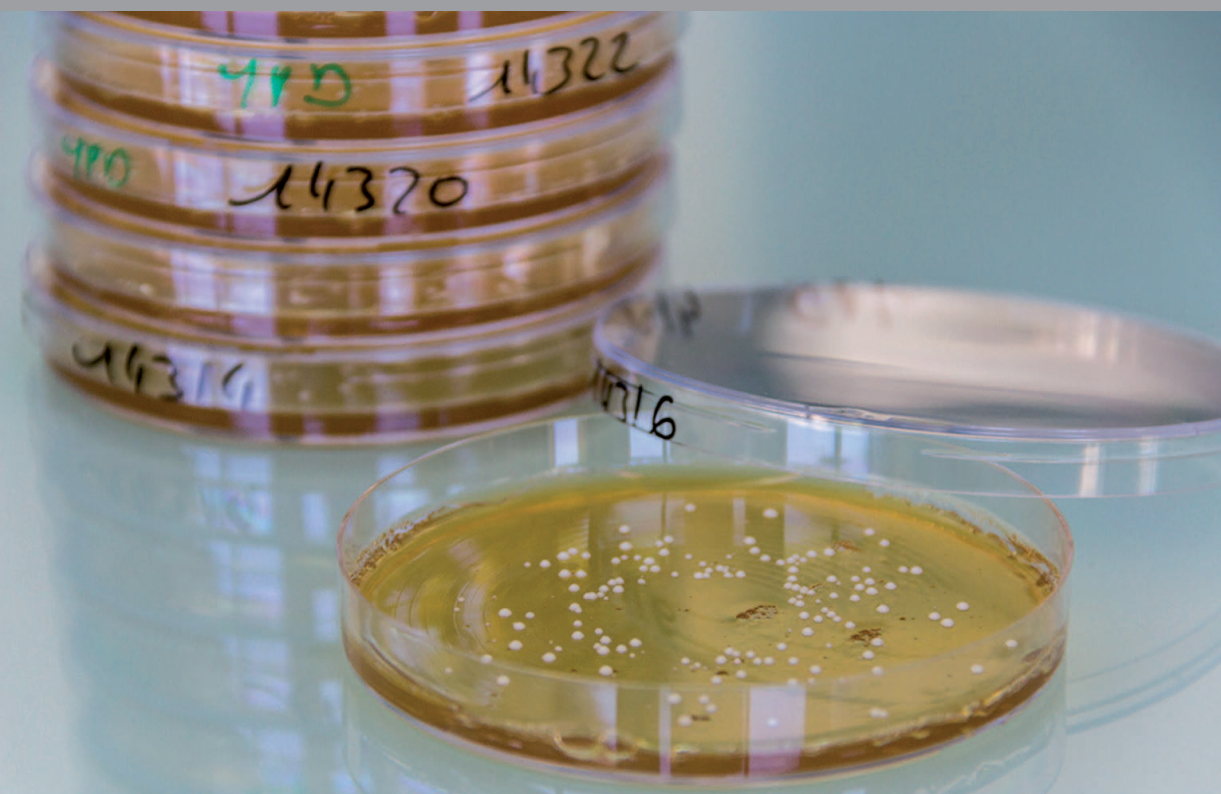
Ces résultats de suivi de la population des levures pendant la FA, dans ces deux conditions nutritives différentes, apportent des observations intéressantes :

- Le manque d'azote entraîne un développement plus restreint de la population de levures, mais l'activité métabolique de celles-ci est tout aussi bonne qu'en condition nutritive optimale

- La vitesse de FA plus faible dans la modalité carencée est expliquée par cette population de levure plus faible, et non pas forcément par une activité métabolique réduite.

- En cas de carence, l'activité métabolique des levures commence à diminuer alors que les apports glucidiques sont toujours assurés (baisse de la population active avant la fin de la FA). Ceci peut expliquer des cas d'arrêt fermentaire sur des moûts carencés en azote.

Au vu de ces observations, on peut noter que l'activité des levures peut être une information intéressante pour suivre les fermentations alcooliques. La technique de cytométrie permet ce suivi rapide et simple, et en cas de ralentissement de la FA, elle peut apporter des informations importantes sur l'état physiologique des levures en complément d'un suivi de densité uniquement.



CONCLUSION

Cette série d'expérimentations n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre un itinéraire conventionnel et un itinéraire en culture biologique. Nous proposons deux hypothèses : soit l'effet des pratiques concernées est trop discret pour être visible à l'échelle du système global vigne-vin ; soit nous ne disposons pas des outils permettant de mettre en lumière cet effet. C'est probablement dans les deux directions que le programme de recherche pourrait avancer à l'avenir, tant la question de l'agriculture biologique est un paradigme en soi.

Ce programme de recherche a été financé par France Agrimer et coordonné par SudVinBio, l'interprofession des vins bio du Languedoc-Roussillon. Inter Rhône remercie l'IFV et l'ICV pour leur partenariat dans l'obtention des résultats présentés ici, et pour les collaborations à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- Diguta F.C., 2010. Ecologie des moisissures présentes sur les baies de raisin. Thèse de doctorat en Sciences de l'alimentation de l'université de Dijon.
- Murat M.L. & Gourraud C., 2008. Macération préfermentaire en rouge : maîtrises des risques et alternatives. *La revue française d'œnologie*. **230**.
- Sablayrolles J.M. & Salmon J.M., 2009. Déroulement et contrôle de la fermentation *in* Le vin Rosé, C. Flanzy, G. Masson, F. Millo - Editions Féret - 2009
- Vincent B., 2006. *Brettanomyces* et phénols volatils. Prévenir et limiter les altérations. Collection itinéraires **12**, IFV, 27p.