

# La bioprotection en œnologie

## Impacts microbiologiques et conséquences œnologiques

Bastien Nazaris<sup>1</sup>, Sara Windholtz<sup>2</sup>, Julie Barthoux<sup>1</sup>, Emmanuel Vinsonneau<sup>3</sup>, Stéphane Becquet<sup>4</sup>, Isabelle Masneuf-Pomarede<sup>2, 5</sup>, Joana Coulon<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Laffort – Floirac – France.

<sup>2</sup> UR Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA – Bordeaux INP – Université de Bordeaux – France.

<sup>3</sup> IFV – Pôle Bordeaux Nouvelle-Aquitaine – Blanquefort – France.

<sup>4</sup> VBNA – Montagne – France.

<sup>5</sup> École nationale supérieure des sciences agronomiques de Bordeaux-Aquitaine – France.

<sup>6</sup> Biolaflort – Floirac – France.



Extrait de la Revue  
des Œnologues n° 176  
[search.oeno.tm.fr](http://search.oeno.tm.fr)

### Introduction

La bioprotection est définie comme un procédé visant à appliquer un microorganisme vivant dans le but de coloniser le milieu dans lequel il est ensemencé, afin de limiter le développement d'une flore non qualitative et les altérations qu'elle génère. Dans la pratique, il s'agit très souvent de levures de type non-*Saccharomyces*. Ce terme regroupe en réalité un ensemble très hétérogène de genres et d'espèces dont nombre d'entre eux sont délétères à la qualité du vin. Le choix du microorganisme doit donc reposer à la fois sur des critères liés à l'espèce (faiblement fermentaire mais ayant la capacité de se maintenir dans le moût; ne générant pas de défauts), mais aussi à la souche puisqu'au sein de la première, il existe une grande variabilité. De plus, la diversité des contextes œnologiques dans lesquels les agents de bioprotection sont utilisés constitue un paramètre supplémentaire à prendre en compte lors de leur sélection et leur mise en œuvre: les microorganismes choisis doivent être suffisamment robustes pour s'adapter à nombre de situations. Ici, il sera fait mention d'un mélange de deux souches, l'une provenant de l'espèce *Torulaspora delbrueckii*, l'autre de l'espèce *Metschnikowia pulcherrima*, ce qui nous a semblé être la solution optimale pour répondre à l'ensemble de ces contraintes.

L'utilisation d'agents de bioprotection s'inscrit principalement

(mais pas seulement) dans un contexte de diminution du SO<sub>2</sub> et pour l'instant s'applique uniquement sur vendange et sur moût. En effet, les vinificateurs cherchent depuis quelques années à limiter et même bannir l'utilisation du dioxyde de soufre lors du processus de vinification. Néanmoins, les données scientifiques sur les mécanismes exacts qui sous-tendent l'application de la bioprotection et ses conséquences œnologiques sont encore trop rares.

### Effet du SO<sub>2</sub>, de son absence et de l'utilisation de la bioprotection sur la communauté des levures du moût

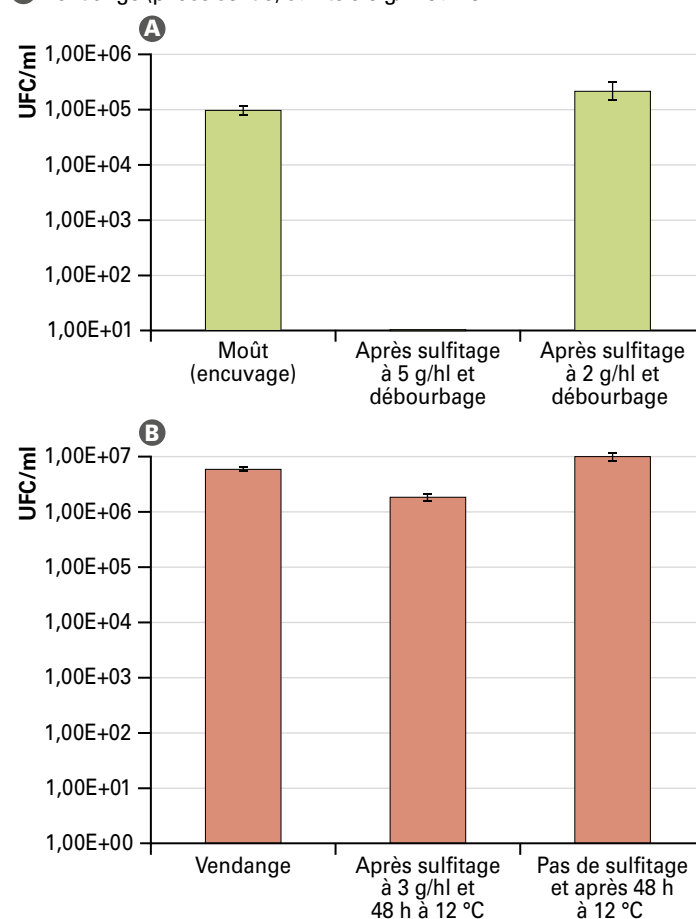
#### Effet du sulfitage sur les levures indigènes du moût

La bioprotection vise aujourd'hui souvent à remplacer totalement ou partiellement le SO<sub>2</sub> ajouté lors de la période préfermentaire pour son action antimicrobienne, c'est-à-dire, dès que le raisin est vendangé et jusqu'au début de la fermentation alcoolique. L'impact microbiologique du SO<sub>2</sub> peut être variable et fonction de la pression microbienne. La **figure 1** montre deux exemples de l'impact d'une diminution ou suppression du SO<sub>2</sub> sur les levures non-*Saccharomyces* (sur moût les levures non-*Saccharomyces* représentent en général la totalité des levures indigènes).

■ **Figure 1 : Évolution des levures non-*Saccharomyces* de moûts entre l'encuvage et la fin de la période préfermentaire. Le sulfitage, s'il a lieu, est effectué après encuvage.**

A Moût blanc sulfité à 5 ou 2 g/hl.

B Vendange (phase solide) sulfité à 3 g/hl ou non.



Dans le cas du vin blanc, le sulfitage à 5 g/hl permet de diminuer la population cultivable de levures non-*Saccharomyces* en deçà de son seuil de détection (même si des populations viables mais non cultivables peuvent subsister). En revanche, cette dernière se développe lors du débouillage lorsque le moût n'est sulfité qu'à 2 g/hl. À l'inverse, un sulfitage à 3 g/hl sur moût rouge ne réduit que très partiellement le niveau des levures non-*Saccharomyces* et en son absence, elles se développent pendant la période préfermentaire. Ces exemples montrent donc que l'impact du sulfitage ainsi que sa diminution entraînent des conséquences microbiologiques très différentes selon les conditions œnologiques (état sanitaire, conditions climatiques...) et qu'il est utile de maîtriser cette microflore.

## Biodiversité des levures dans un contexte de réduction du SO<sub>2</sub>, avec ou sans bioprotection

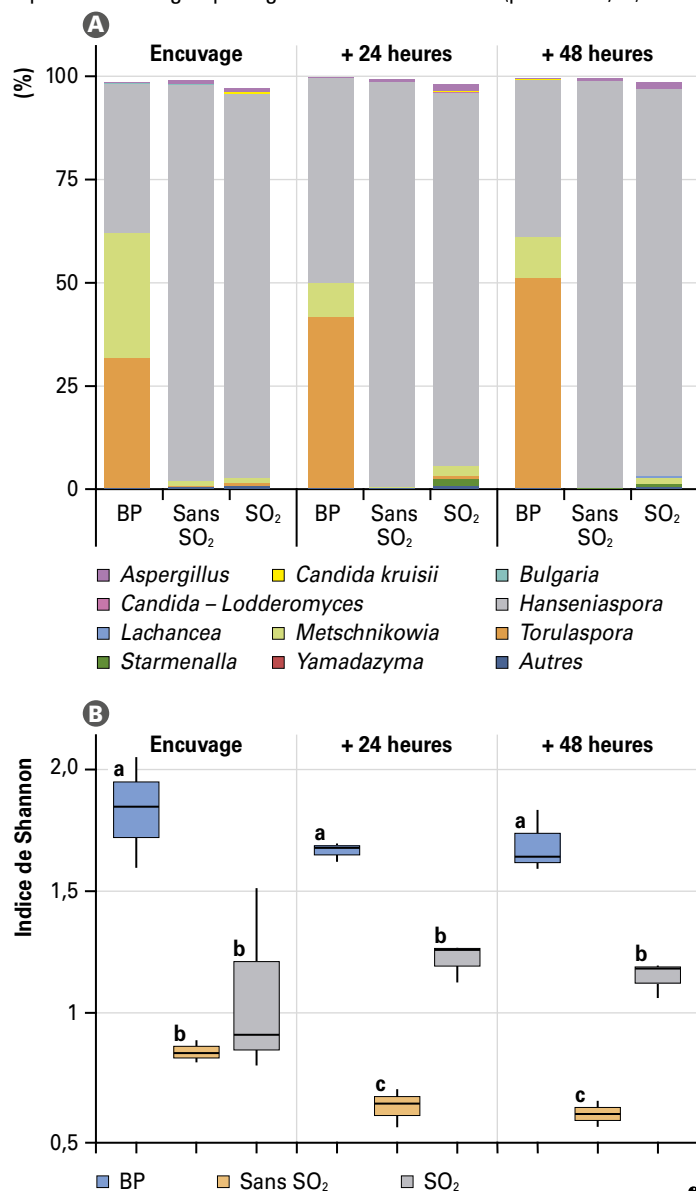
Afin d'appréhender finement l'effet de la réduction des doses de SO<sub>2</sub> avec ou sans bioprotection, trois situations ont été comparées sur un merlot de la région bordelaise. Après égrappage et foulage, la vendange a été équitablement répartie en trois contenants de 35 L par modalité (toutes dupliquées), chacune suivant un itinéraire œnologique similaire à l'exception : – d'un sulfitage de la vendange à 5 g/hl, ce qui correspond à un sulfitage « conventionnel » pour la première ; – de l'absence de sulfitage de la vendange pour la deuxième ; – de l'absence de sulfitage avec ajout sur vendange (avant égrappage et foulage) d'un agent de bioprotection à 5 g/hl (Zymaflore® Eglise) pour la troisième.

Avant ensemencement avec une levure de type *S. cerevisiae* pour un départ en fermentation alcoolique, les moûts subissent une phase préfermentaire de 48 heures à 10 °C. Pendant cette période, des analyses

■ **Figure 2: Impact du sulfitage, absence de sulfitage avec ou sans bioprotection sur les levures du moût à différents stades préfermentaires.** « SO<sub>2</sub> » : moût sulfité à 5 g/hl – « sans SO<sub>2</sub> » : moût non sulfité – « BP » : moût non sulfité et bioprotégé.

▲ **Bilans (indiqués en pourcentage) des différents genres présents.** Ces bilans sont réalisés selon la méthode de Meta barcoding, séquençage MiSeq, puis analyse bioinformatique.

● **Indice de biodiversité intra-échantillon** (indice de Shannon) : a b et c représentent des groupes significativement différents (p value < 0,05).



microbiologiques journalières sont réalisées (0, 24 heures et 48 heures). Pour cela, l'ADN des échantillons est extrait puis traité de façon à pouvoir connaître de façon exhaustive la totalité de la communauté de levures, par le biais d'un bilan génétique. La **figure 2A** indique les abondances relatives (%) de chaque genre dans les échantillons et permet d'observer à la fois leur évolution dans le temps, mais aussi selon les itinéraires techniques pratiqués. En outre, ces données sont utilisées afin de calculer un indice de biodiversité (indice de Shannon) (**figure 2B**). Ce dernier prend en compte le nombre de genres présents ainsi que leur proportion les uns par rapport aux autres. Plus cet indice est grand, plus la diversité microbienne est importante. En présence de SO<sub>2</sub>, un genre domine, *Hanseniaspora*, bien que de nombreux autres genres soient présents. Ces derniers sont « écrasés » par la forte proportion d'*Hanseniaspora* et faiblement visibles sur la **figure 2A**. L'observation des modalités « sans SO<sub>2</sub> » permet de voir que la prédominance d'*Hanseniaspora* est encore plus forte dans ce cas. Ces différences entraînent une chute significative de l'indice de biodiversité (**figure 2B**) dans la modalité « sans SO<sub>2</sub> ».

L'utilisation d'un agent de bioprotection dans les modalités « BP » montre comme attendu une forte présence des genres/espèces ensemencés, indiquant leur implantation. Leur présence permet de limiter la proportion des autres genres, mais surtout les dominants, de sorte que l'indice de biodiversité augmente par rapport aux deux autres modalités pendant la phase préfermentaire. Ainsi, contre toute attente, l'absence de sulfitage diminue de façon significative la biodiversité des levures sur vendange en surimposant un genre, *Hanseniaspora*, connu pour son impact négatif sur la qualité du vin (augmentation d'acidité volatile et d'acétate d'éthyle). L'utilisation de la bioprotection, même si dans les exemples

donnés ici elle n'a pas permis de diminuer les niveaux de ces populations (données non montrées), participe néanmoins à en diminuer la proportion et ainsi faire augmenter l'indice de biodiversité.

## Conséquences œnologiques de l'utilisation de la bioprotection

### Vinification en rouge avec ensemencement en *S. cerevisiae* pour conduire la fermentation alcoolique

L'absence de SO<sub>2</sub> peut générer de profonds changements sur la quantité mais aussi la qualité microbiologique du moût, et la bioprotection participe à l'enrichir en genres et espèces « qualitatifs ». Dans ce contexte, il est intéressant d'observer ce qui se passe en sortie de phase préfermentaire et jusqu'en fin de fermentation alcoolique (FA). Un essai a été mené comparant, pour une même vendange de merlot de la région bordelaise vinifiée en cuves de 2 hl, un itinéraire non sulfité au même itinéraire non sulfité mais supplémenté à 5 g/100 kg de vendange en agent de bioprotection (Zymaflore® Eglise). Après une phase préfermentaire de 48 heures à 12 °C, les moûts sont ensemencés avec une levure de type *S. cerevisiae* (Actiflore® F33, 20 g/hl) afin qu'elle conduise la fermentation alcoolique. Les contrôles d'implantation indiquent que dans le cas de la modalité sans bioprotection, la souche de *S. cerevisiae* ensemencée ne s'est pas implantée, contrairement à la modalité avec bioprotection (**tableau 1**). Ce sont ainsi des levures *S. cerevisiae* indigènes qui ont réalisé la fermentation alcoolique, certainement accompagnées au départ par les levures non-*Saccharomyces* de la vendange. La bioprotection pratiquée sur vendange a, au contraire, favorisé l'implantation de la levure *S. cerevisiae* en tempérant le développement de la flore indigène du moût. Il faut noter que la pression microbiologique en levures dans

la vendange de départ était particulièrement élevée (6.2.10<sup>6</sup> UFC/ml de levures, exclusivement non-*Saccharomyces*).

Il convient de relier ces différences d'implantation directement aux paramètres chimiques du vin, une fois la fermentation alcoolique achevée. À ce stade bien que certaines données soient similaires entre les vins (TAV, pH, AT), d'autres sont en revanche significativement différentes. C'est le cas de l'acidité volatile, de l'acétate d'éthyle et du TL35 (représentant la concentration théorique en SO<sub>2</sub> total nécessaire pour atteindre un niveau de SO<sub>2</sub> libre de 35 mg/L; il s'agit donc d'un indice sur le niveau de combinaison du vin vis-à-vis du SO<sub>2</sub>), qui sont à des niveaux plus élevés dans la modalité sans bioprotection. À ce stade, leur origine et les différences entre les deux modalités ne peuvent être que microbiologiques et sans doute levuriennes. Bien qu'il soit impossible de savoir précisément quelles levures sont à l'origine de la différence entre les deux modalités (levures non-*Saccharomyces* de la vendange ou bien levures *Saccharomyces cerevisiae* durant la FA), il peut être conclu que ce sont les levures indigènes s'étant développées au détriment des levures ensemencées qui en sont à l'origine. Il est intéressant de noter que dans un contexte de limitation du SO<sub>2</sub> où les éléments d'oxydation doivent être particulièrement observés, la modalité ayant bénéficié de bioprotection développe moins de marqueurs d'oxydation.

### Vinification en rouge et fermentation alcoolique spontanée

La maîtrise de la microflore levurienne indigène du moût est donc importante pour la qualité du vin, surtout en cas de forte pression microbiologique. Celle-ci passe par l'application de bioprotection en début de phase préfermentaire, mais aussi par l'utilisation de levures sélectionnées pour réaliser la fermentation alcoolique. Néanmoins, dans certains cas, aucun levain n'est appliqué, pour

■ **Tableau 1 : Essai sur merlot avec ensemencement en *S. cerevisiae* pour réaliser la fermentation alcoolique.** Le contrôle d'implantation est réalisé par analyse génétique (PCR delta) sur plusieurs colonies de levures. Les analyses chimiques ont été sous-traitées au laboratoire Excell (Floirac, France). **Fin FA:** TAV = 13,7 % vol; pH = 3,4; AT = 3,6 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

|                                            |                                                                                         | Non sulfité            | Non sulfité + bioprotection |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <b>Analyse au tiers de la FA</b>           | <b>Implantation de la souche de <i>S. cerevisiae</i> ensemencée pour réaliser la FA</b> | < 20 % (non implantée) | > 80 % (implantée)          |
| <b>Analyses en fin de FA (à l'écouage)</b> | TL35 (mg/L)                                                                             | 74                     | 61                          |
|                                            | Acétate d'éthyle (mg/L)                                                                 | 86                     | 61                          |
|                                            | AV (g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )                                                | 0,22                   | 0,13                        |

■ **Tableau 2 : Essai sur syrah avec fermentation alcoolique spontanée.** Les prélèvements sont réalisés à densité 1,010 à 1,030. L'étude des levures est faite par un isolement sur milieu de culture, puis analyse génétique (PCR delta). Cette dernière permet à la fois d'indiquer si la colonie analysée correspond ou non à une levure *S. cerevisiae* et discriminer les souches entre elles.

|                                      | Analyses des levures                             |                                             |                                                       |                                    |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                      | Pourcentage de levures non- <i>Saccharomyces</i> | Pourcentage de levures <i>S. cerevisiae</i> | Nombre de souches différentes de <i>S. cerevisiae</i> | Pourcentage de la souche dominante |
| <b>Cuve témoin (non bioprotégée)</b> | < 10 %                                           | > 90 %                                      | 9                                                     | 20 %                               |
| <b>Cuve BP (bioprotégée)</b>         | < 10 %                                           | > 90 %                                      | 7                                                     | 40 %                               |

une FA spontanée. Afin d'illustrer ce cas, un essai a été réalisé dans un domaine sur deux cuves, remplies chacune avec une vendange homogène de raisins foulés et égrappés de syrah. Après sulfitage comme réalisé habituellement au domaine, une cuve est ensemencée en agent de bioprotection (Zymaflore® Egide à 5 g/hl), l'autre non. Les bilans microbiologiques régulièrement réalisés montrent que les espèces composant la bioprotection sont bien présentes et à des niveaux importants dans la cuve bioprotégée uniquement (données non montrées). En cours de fermentation alcoolique, un état des lieux des levures est effectué afin de connaître les espèces présentes et établir un inventaire de la diversité des souches (**tableau 2**). Ces analyses indiquent qu'en cours de FA, les populations de levures sont exclusivement constituées de l'espèce *S. cerevisiae*. Il est néanmoins possible que les espèces *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* composant l'agent de bioprotection aient partiellement démarré la fermentation alcoolique de la modalité correspondante (d'où l'intérêt de sélectionner des souches à impact organoleptique neutre ou positif). Par ailleurs, la bioprotection semble favoriser l'émergence d'une souche majoritaire de *S. cerevisiae*, en augmentant la proportion d'une souche et réduisant le nombre de

souches de *S. cerevisiae* différentes. Ainsi, comme précédemment, mais dans une autre mesure puisqu'il s'agit là d'une fermentation spontanée souhaitée, l'utilisation de la bioprotection a eu un impact sur la flore indigène fermentaire. Elle a permis de concentrer davantage le nombre de souches participant à la fermentation alcoolique, et, en œnologie, la prise du milieu par un nombre limité de souches participe souvent à l'efficacité de la dégradation des sucres. En fin de FA, bien que ces différences soient faibles, la teneur en acétate d'éthyle est moins élevée dans la modalité bioprotégée « BP » (24 mg/L) que dans la modalité « témoin » (33 mg/L). Même si ces niveaux sont acceptables, ces différences soulignent tout de même des comportements fermentaires différents. Des variations ont été aussi détectées dans les niveaux de bactéries acétiques (plus élevés sans bioprotection, données non montrées), ce qu'il conviendra d'étudier plus en détails dans d'autres essais.

### Conclusion

La bioprotection est une pratique de plus en plus utilisée dans un contexte général de réduction des sulfites. L'absence de sulfitage entraîne une diminution de la biodiversité des levures due à la colonisation d'espèces parfois non souhaitées et majoritaires dans le moût (notamment *Hanseniaspora uvarum*). Ces résultats montrent l'intérêt de la bioprotection dans le rétablissement de situations microbiologiques favorables et donc plus à mêmes d'assurer la qualité du vin. Cela est notamment perceptible au travers de marqueurs de l'oxydation tels que l'acidité volatile, l'acétate d'éthyle et l'éthanal, dans des proportions qui dépendent beaucoup de la pression microbiologique indigène ainsi que des itinéraires œnologiques pratiqués. ■



Article publié avec l'aimable autorisation de la Revue des Œnologues

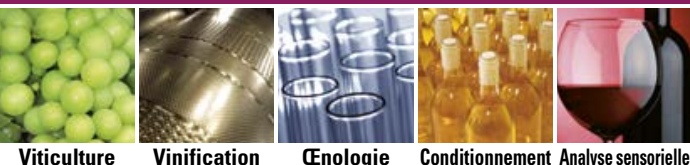
N° 176 – Juillet 2020 – p. 32 à 34

"La bioprotection en œnologie – Impacts microbiologiques et conséquences œnologiques" – Bastien Nazaris, Sara Windholtz, Julie Barthoux, Emmanuel Vinsonneau, Stéphane Becquet, Isabelle Masneuf-Pomarede, Joana Coulon

La référence internationale de l'actualité scientifique et technique vitivinicole, depuis plus de 44 ans en France et dans 60 pays ■ Plus de 1 200 articles archivés par mots clés [search.oeno.tm.fr](http://search.oeno.tm.fr) ■ Pour tout contact : [infos@mail.oeno.tm.fr](mailto:infos@mail.oeno.tm.fr) ■

# revue des œnologues

Sciences et techniques de la vigne et du vin  
et des techniques vitivinicoles et œnologiques



Le trimestriel de  
tous les acteurs  
de la filière  
vitivinicole

## L'actualité scientifique & technique

- Depuis plus de 40 ans, dans 60 pays
- Revue internationale en langue française
- Viticulture | Œnologie | Conditionnement

## Le trimestriel des acteurs de la filière

« Les lecteurs de la Revue des Œnologues sont à la recherche d'informations fiables et de conseils techniques précis pour réaliser des investissements concrets et mettre en place des solutions opérationnelles en viticulture et œnologie.

Aujourd'hui, plus que jamais, il est indispensable d'être bien informé et ce, par des professionnels conscients des réalités et des enjeux techniques de la filière ».

**Henri-Laurent Arnould**  
Ingénieur agronome œnologue  
Directeur de la Revue des Œnologues



search.oeno.tm.fr



## À la source de l'information

- Accès libre à un large corpus d'informations scientifiques & techniques
- Informations évaluées et sélectionnées, depuis plus de 40 ans, par la Revue des Œnologues

## Plus vite à l'essentiel...

- Accès rapide par mots-clés
- Résumés, bibliographies, listes d'articles
- Plus de 6 000 articles et 5 000 contributeurs



**search.oeno.tm.fr**  
Moteur de recherche | Viticulture  
Œnologie | Revue des Œnologues