

Bio-diversité : de l'analyse à la crème de levures!

En œnologie, depuis que les études d'écologie microbienne bénéficient d'outils d'analyses génétiques performants, les informations fournies aux praticiens se sont considérablement élargies. Ces avancées techniques apportent une meilleure description des populations microbiennes œnologiques mises en jeu. Cela est désormais bien établi ; la flore œnologique ne se limite pas ni à *Saccharomyces* pour la fermentation alcoolique, ni à *Oenococcus* pour la fermentation malolactique et ni, fâcheusement, à *Brettanomyces* pour les altérations. **C'est bien un consortium microbien beaucoup plus diversifié auquel nous avons à faire.**

A tout niveau, les acteurs de la filière se sont ouverts à ces données. Chez les industriels, le nombre de souches sélectionnées de *Saccharomyces cerevisiae* continue à progresser. Parmi elles une grande majorité provient encore d'isolements lors de fermentations dites spontanées. Les critères de sélection, basés sur des analyses de plus en plus précises, se sont considérablement affinés. De nombreuses souches de levures non-*Saccharomyces* ont également été rapidement proposées ces dernières années. C'est également le cas pour les bactéries lactiques. Les associations ou cocktails de souches sont aussi désormais disponibles aux vinificateurs souhaitant reproduire ce qui est observé dans la nature où ce n'est jamais une seule souche qui agit mais bien plusieurs. Bien que « sur le papier » ces associations revêtent d'un grand intérêt, dans les faits ce n'est pas toujours facile à assurer.

D'un autre côté, chez les vignerons souhaitant de plus en plus raisonner l'usage d'intrants ou d'auxiliaires technologiques, le recours à la flore dite indigène est de plus en plus d'actualité. **L'amélioration des connaissances et l'expertise analytique de quantification et de détermination génétique des souches spontanément présentes sécurisent fortement ces démarches.** En effet ces avancées techniques appréhendent certains critères importants comme les aptitudes fermentaires, les faibles productions d'acidité volatile, les révélations d'arômes, la compatibilité avec les bactéries de la FML. En amont au laboratoire, l'optimisation des procédés de multiplication des cellules apportent également beaucoup de garantie aux praticiens.

D'un point de vue analytique, la connaissance de la microflore spontanément présente sur les raisins et le recours à cette « biodiversité » ouvrent deux principales voies.

- **La première est de nature *observatoire* :** caractériser le consortium microbiologique présent sur les baies de raisins au moment des vendanges

A l'image des suivis de maturité qui visent à caractériser les raisins à l'approche de leur récolte, les analyses microbiologiques sur raisins complètent cette caractérisation en apportant des données sur le consortium microbiologique présent sur la baie de raisins. L'objectif n'est pas ici de savoir si cette biomasse microbienne pourra assurer les fermentations mais seulement d'associer ces données aux paramètres physico-chimiques plus classiques qui caractérisent le raisin et les conditions d'un millésime.

- **La seconde est de nature *opératoire* :** maîtriser la flore indigène lors des fermentations.

Une fois observée, la microflore spontanément présente sur les raisins lors des vendanges peut-elle être bénéfique ou préjudiciable ? Doit-elle être exploitée ou éliminée ? Ici l'objectif est bien de savoir s'il est possible de piloter la biodiversité microbienne présente sur les raisins.

Ces deux options ne sont pas obligatoirement adjointes ou du moins la première peut être mise en œuvre même si l'objectif est de recourir à un levurage classique. Dans ce cas la connaissance de la population sur raisins permet de décider de quand, comment et combien inoculer afin d'assurer l'implantation de la LSA en connaissant précisément la pression concurrentielle de la flore indigène. De même, la deuxième voie, celle de nature opératoire visant à exploiter la biodiversité, sera d'autant plus pertinente si la voie analytique a été mise en œuvre en amont car celle-ci fournit indubitablement les premiers éléments de réponses. Par exemple, si durant la campagne la population de bactéries est ultra-majoritaire sur raisins, il est évidemment plus délicat de chercher à extraire une levure indigène pour réaliser la fermentation alcoolique.

Disposant d'expériences solides en écologie microbienne et de l'ensemble des dispositifs analytiques actuellement disponible en microbiologie œnologique (microscopie, milieux de culture liquides et solides, PCR, cytométrie), le laboratoire EXCELL a fait de ces deux approches ses spécialités. L'objectif de ce document est de détailler pratiquement ces deux voies d'approches.



1- Observer la microflore présente spontanément sur les baies de raisins

Invisible à l'œil nu, une communauté microbienne riche et diversifiée tapisse la baie de raisins. Par des outils relativement simples, l'analyse de cette communauté apporte des éléments pertinents tant d'un point de vue quantitatif et qualitatif.

La figure 1 illustre par exemple les suivis des populations microbiennes moyennes sur le vignoble bordelais depuis le millésime 2003.

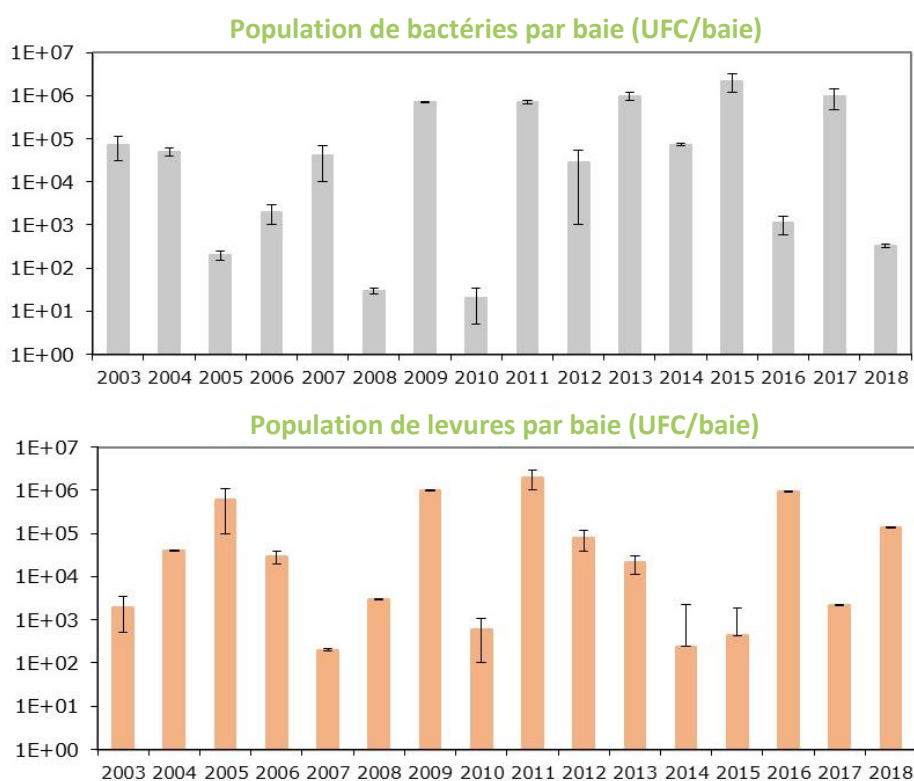


Figure 1 : Populations de levures totales et de bactéries par baie de raisins. Moyenne obtenue sur l'ensemble des prélèvements réalisés lors des vendanges pour un millésime donné.

La figure 2 présente quant à elle l'évolution de la population de levures sur les baies de raisins lors du millésime 2018. Si l'analyse individuelle des données moyennées de la figure 1 atteste que d'ordinaire cette population croit de façon relativement linéaire lors de la maturation du raisin, remarquons que le millésime 2018 a été marqué par un point d'inflexion très net qui comparait aux données physico-chimiques disponibles s'avère concomitant à la perte en volume des raisins (les semaines 37 et 38 correspondaient à des pertes hebdomadaires de 6 à 8% du poids des raisins) et à l'accélération du phénomène de concentration des raisins. A partir de ce moment, les raisins devenaient de plus en plus pourvus en levures et se concentraient. Ces phénomènes ont certainement participé aux fins de fermentation parfois délicates.

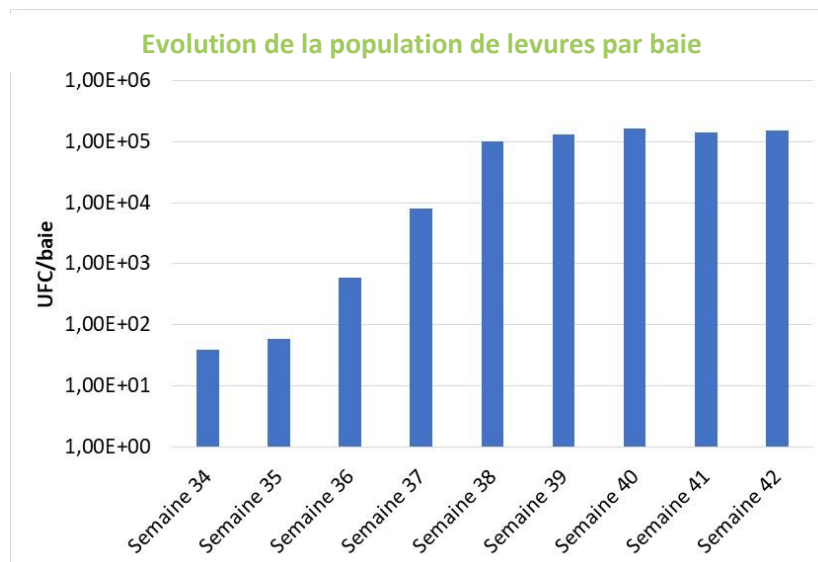


Figure 2 : Résultats semaine par semaine des dénombrements de levures totales par baie lors des vendanges 2018 à Bordeaux. La valeur présentée dans la figure 1 concernant le millésime 2018 reprend ces données en les pondérant par le nombre d'analyses réalisées chaque semaine.

Ces mises en parallèle permettent aujourd'hui de consolider des hypothèses rapidement formulées lors de l'obtention des premières données en matière de populations microbiennes sur raisins. Par exemple, lorsque les conditions du millésime sont favorables à la formation de baies relativement volumineuses et de pellicules fragiles, les bactéries et notamment les *Gluconobacter* sont particulièrement présentes sur les raisins. A l'inverse lorsque les conditions favorisent la formation des baies plus petites disposant de pellicules plus solides, les levures sont alors prédominantes.

Evidemment l'évocation des levures amènent aussi à s'interroger sur la plus redoutée d'entre-elles : *Brettanomyces* ! Il est désormais possible d'analyser la présence de *Brettanomyces* sur les raisins et même de caractériser cette population. Pour y parvenir, 2 méthodes peuvent être mise en place :

- **La méthode « directe » :** on place les raisins dans une solution de lavage puis l'on cherche à détecter *Brettanomyces* dans cette solution
- **La méthode « indirecte » :** dans ce cas les raisins sont placés dans un milieu plus favorable à la croissance de *Brettanomyces* qu'aux autres microorganismes (milieu dit d'enrichissement) et l'on réalise la détection de *Brettanomyces* dans ce milieu après plusieurs jours de contact avec les raisins. Lorsque *Brettanomyces* est détectée par la méthode indirecte et pas par la méthode directe cela signifie que *Brettanomyces* est bien présente sur les raisins mais de façon très minoritaire.

Evidemment il ne s'agit pas d'une *Brettanomyces* mais bien de plusieurs *Brettanomyces*. En effet, aucun doute possible, les études le prouvent, de nombreuses souches existent et chacune présentent des spécificités. Ces phénomènes ont ainsi alimenté d'incessant débats : les *Brettanomyces* responsables des productions de phénols volatils dans les vins viennent-elles des raisins ou pas ? Récemment la mise en place du test TYP\Brett a permis d'apporter des éléments de réponse à cette question fondamentale. Le test TYP\Brett est basé sur la découverte par l'équipe du professeur Isabelle Masneuf-Pomarède à l'ISVV de Bordeaux de la triploïdie responsable de la résistance aux sulfures chez *Brettanomyces*. TYP\Brett distingue les souches de *Brettanomyces* résistantes au soufre (c'est-à-dire susceptibles de se développer et de produire des phénols volatils dans les vins même si le SO₂ actif est supérieur à 0,4 mg/L) et les souches de *Brettanomyces* sensibles. Lors du millésime 2018 sur les centaines d'isolats de *Brettanomyces* obtenus lors des analyses pratiquées sur raisins, aucune souche triploïde résistante n'a pu être détectée sur raisins alors que le phénomène inverse est observé à la surface des contenants ou du matériel à la cave. *Des Brettanomyces sont donc bien présentes sur le raisin mais il ne s'agirait probablement pas des mieux armées pour se développer dans les vins et persister à la cave.* Leur détection sur raisins revêt tout de même d'un intérêt évident dans le choix des premières étapes de la vinification, le sulfitage de la vendange en premier lieu.

Tableau 1 : Les propositions d'EXCELL en matière d'analyse de la microflore analytique sur raisins.

Analyses et comparaison des résultats par rapport aux bases de données	Dénombrement		Détection en méthode directe			Détection en méthode indirecte	Caractérisation
	levures totales	bactéries totales	<i>Brettanomyces</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Brettanomyces</i>	TYP\Brett
Formule classique	X	X					
Formule classique +	X	X	X				
Formule globale	X	X	X	X	X		
Formule Brett +	X	X	X			X	
Formule Brett ++	X	X	X			X	X

2- Piloter la microflore présente spontanément sur les baies de raisins

Le recours à la flore indigène n'est pas une nouvelle pratique. Cependant, les techniques analytiques récentes visant à s'assurer des qualités et de l'absence de métabolites préjudiciables ont permis de sécuriser ces procédés.

Afin de répondre à une demande croissante, EXCELL a mis au point deux processus distincts.

Le premier consiste à exploiter la *biodiversité* en réalisant des crèmes de levures issues de pied-de-cuves dirigés et contrôlés. Elles sont constituées de l'ensemble des souches de levures présentes spontanément sur les raisins et possédant de bonnes aptitudes pour se développer dans le moût et fermenter.

Le second est un vrai processus de *biosélection* et de caractérisation d'une souche précise. Il est plus long et plus fastidieux mais peut permettre la mise en exergue des qualités remarquables d'une entité microbienne naturellement présente sur un lot de raisin et d'en tirer bénéfice à plus grande échelle et sur une période plus longue (reproduction les millésimes suivants).

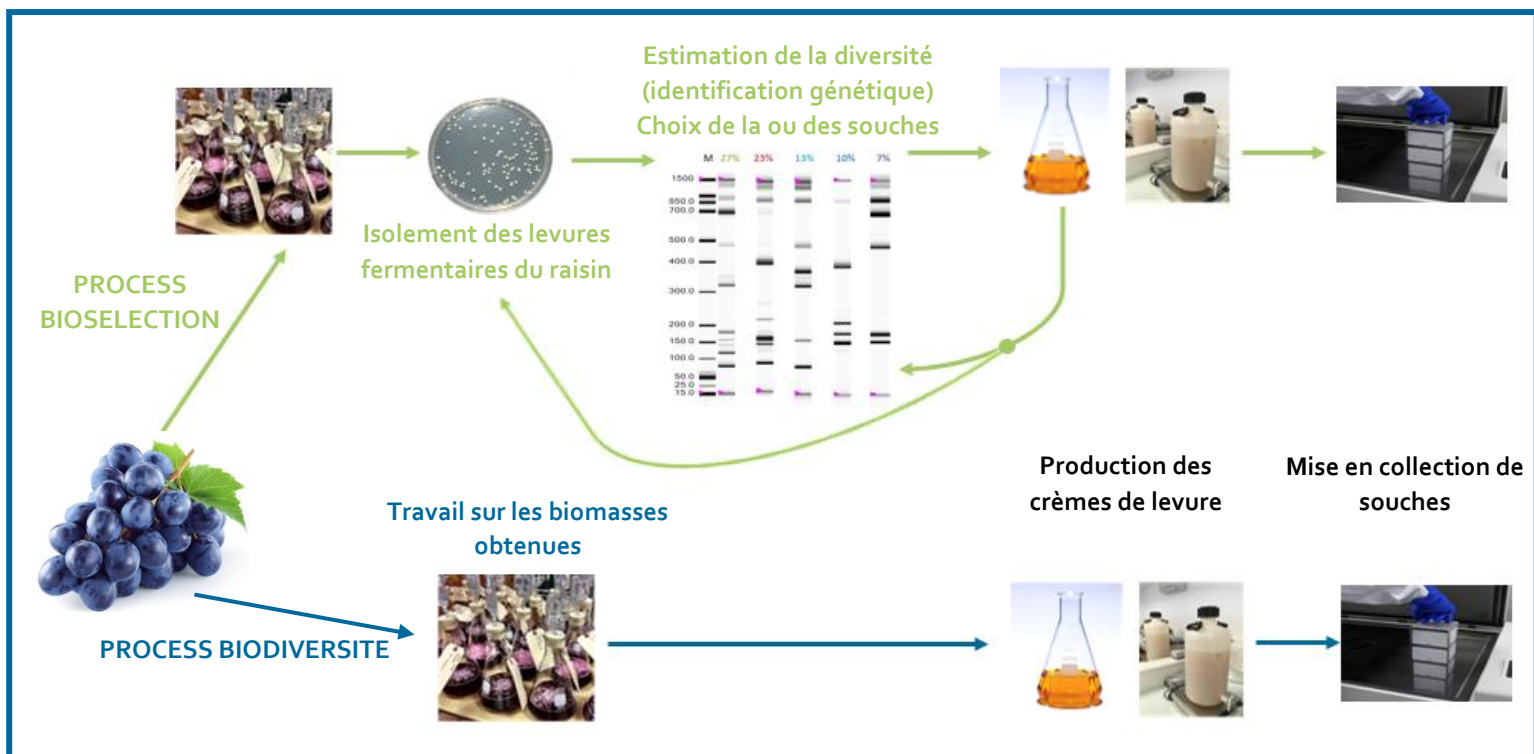


Tableau 2 : Les deux protocoles mis en place au laboratoire EXCELL de production de crèmes de levures à partir du consortium microbiologique présent sur les raisins.

Protocole	Objectifs	Délivrable	Timing
Protocole « Biodiversité »	Exploiter et piloter la biodiversité en utilisant un cocktail de souches de levures naturellement présentes sur le raisin dont les potentialités fermentaires ont été validées au laboratoire (tout comme l'absence de flore indésirable)	Une crème de levures (500 mL d'une crème à environ 10^9 cell/mL) avec plusieurs souches de levures non- <i>Saccharomyces</i> et <i>Saccharomyces</i> (indication fournie sur la fiche technique de la crème) à utiliser pour inoculer directement les moûts ou pour réaliser de la bio-protection avant une inoculation plus classique avec une LSA	10/15 jours avant les vendanges, collecte des raisins
Protocole « Biosélection »	Isoler spécifiquement une souche remarquable pour ses aptitudes fermentaires (assèchement franc et complet des sucres notamment du fructose généralement le plus délicat à dégrader en fin de FA, faible production d'AV...) ou globales (révélation d'arômes, gras et sucrosité...)	Une crème d'une souche unique de levure parfaitement caractérisée (500 mL d'une crème à environ 10^9 cell/mL)	- 15/20 jours avant les vendanges, collecte des raisins Ou - Réalisation lors des vendanges n -1 pour une production de crèmes lors des vendanges n

Pour ces deux protocoles, la maîtrise et le savoir-faire du laboratoire EXCELL sont essentiels aux différentes étapes clés :

1) le pilotage de la fermentation au laboratoire : nos outils permettent d'aboutir au cocktail de souches les plus pertinentes (protocole « biodiversité ») ou à la souche la plus performante (protocole « bio-sélection »)

2) les actions de contrôles (pression de sélection...) et d'analyses

3) la production de crème de levures

Notre diversification récente en matière de brasseries artisanales et semi-industrielles où ces procédés sont fréquents nous a permis de gagner fortement en compétence en la matière. De plus, le développement récent de la cytométrie de flux au laboratoire permet également de mieux préciser l'état de viabilité et d'activité des productions réalisées.

Toutes nos productions sont désormais associées d'une fiche technique indiquant le type de population (cocktail de souches ou souches pures) et caractérisant la viabilité et l'activité de la population avec des recommandations d'usages.

Pour généraliser ces protocoles aux vignobles les plus éloignés du laboratoire des boîtes de collectes de raisins en amont et des processus d'acheminement des crèmes en conditions optimisées en aval ont également été mises en place.

A la demande de certains partenaires, nous tentons désormais d'adopter une méthodologie similaire pour la production de crèmes de bactéries. Le but est ici d'aider au déclenchement de la fermentation malolactique mais aussi de protéger le milieu entre les deux fermentations, qui dans cette phase microbiologique vide, est parfois propice au développement de germes indésirables (*Brettanomyces*, goût de souris...).

Pour toute demande complémentaire :

vrenouf@sarco.fr