Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1991, **25**, N° 3, 149-165

INCIDENCE DU DÉVELOPPEMENT DE *DEKKERA/ BRETTANOMYCES* DANS LES MOUTS ET LES VINS

Françoise LARUE, N. ROZES, Isabelle FROUDIERE, Caroline COUTY et G.P. PERREIRA

Institut D'Œnologie, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)

Résumé *: Les levures du genre* Dekkera/Brettanomyces *sont des cellules caractéristiques, de petites tailles , de forme ogivale. Leur niche écologique a été précisée à partir de prélèvements sur des raisins, des moûts en fermentation, des vins en cours d'élevage ou de conservation en bouteilles, de différentes appellations de la région bordelaise et du Beaujolais; les clones isolés sont identifiés. C'est une levure de contamination des chais et du matériel vinaire. Leur incidence sur les caractères organoleptiques des vins a été étudiée : cette étude a confirmé que c'est généralement une levure d'altération modifiant profondément la qualité des vins.*

INTRODUCTION

Les levures du genre *Dekkera*, forme parfaite du genre *Brettanomyces* sont connues depuis très longtemps. En effet, dès 1904, CLAUSSEN signala leur présence dans le moût de bière (DOMERCQ, 1956); en particulier le développement de *Brettanomyces lambicus* est encore recherché pour la production de bières spéciales (Gueuze) (VERACHTER et *al.* 1989). Cependant, elle est généralement considérée en brasserie comme une levure de contamination, particulièrement dangereuse, dans la mesure où elle peut entraîner dans les bières non pasteurisées, une « superatténuation » et l'apparition de faux-goûts dus à leur production de composés acides (GAY et *al.*,1979).

Ces levures ont été retrouvées par de nombreux auteurs, dans des vins de différents pays et régions de France, (SCHANDERL et DRACZINSKI, 1952), dans des vins mousseux allemands, (BARRET et *al.,* 1955), dans des vins jaunes d'Arbois, (GALZY et RIOUX, 1955), dans des vins du Midi de la France présentant la maladie de « la fleur ». A l'Institut d'Œnologie de Bordeaux en 1956, DOMERCQ, dans son étude « sur la classification des levures de vin de la Gironde », rapporte l'isolement de 4 souches de *Brettanomyces* parmi les 230 prélevées dans des moûts des appellations Saint-Emilion et Premières-Côtes-de-Bordeaux ainsi que 3 souches parmi les 207 isolées de 70 échantillons de vins rouges et blancs en cours de conservation des appellations Médoc, Graves, Saint-Emilion.

A partir de ces souches isolées, PEYNAUD et DOMERCQ (1956) ont conduit une étude approfondie du métabolisme de ces levures et ont montré qu'elles étaient capables de former de très fortes concentrations d'acide acétique (de 0,8 à 3,7 g/l d'acidité volatile selon les conditions d'aération) ainsi qu'une odeur caractéristique très désagréable rappelant l'acétamide d'où le nom de « goût de souris ». Ces auteurs la classent donc parmi les levures d'altération; elle serait absente du raisin et présente dans les chais mal entretenus et sur le matériel vinaire usagé (vieilles barriques).

Plus récemment, en 1986, les levures du genre *Dekkera/Brettanomyces* ont été retrouvées à l'origine de certaines odeurs désagréables, qualifiées de « sueur de cheval », dans des vins californiens et bordelais conservés en barriques neuves (FROUDIERE et LARUE, 1990). Elles ont été isolées en particulier aux Etats-Unis par la société SIMI-WINERY.

De plus en 1989, DE MINIAC a pu l'isoler à partir de moûts de molasses en fermentation. Il a montré que leur croissance était stimulée par l'oxygène (effet Custer) et par un pH élevé.

L'ensemble de ces données a suscité l'intérêt de repréciser l'écologie de cette levure ainsi que de définir leurs conditions de survie dans les moûts et les vins.

Un poster, présenté au IV^{ème} Symposium International d'Œnologie, donnait nos premiers résultats (FROUDIERE et LARUE, 1990) :

a) Une technique spécifique et fiable d'isolement et d'identification de ces levures a été proposée.

b) Ces levures sont capables de croître en présence de *S.cerevisiæ* dans les moûts en fermentation. De plus, étant donné leur résistance aux fortes concentrations d'antiseptiques couramment utilisées dans les vins (anhydride sulfureux, acide sorbique) et à l'éthanol (15 p. cent), elles peuvent être à l'origine de la refermentation des vins.

c) Un moyen d'inhiber leur développement et leur survie est de rajouter dans les vins, en même temps que l'anydride sulfureux, des acides gras à courtes chaînes à la dose de 9 mg/l (l'autorisation d'emploi de ces molécules est en cours de demande).

Ainsi, nos recherches se sont poursuivies et dans ce travail, nous précisons la niche écologique de ces levures, leur incidence sur la constitution chimique des vins et formulons une hypothèse sur l'origine de l'antagonisme *Dekkera/Saccharomyces*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le milieu de croissance utilisé est du moût de raisin titrant 140 g de sucre par litre.

Les levures utilisées sont de deux genres différents :

- *Saccharomyces cerevisiæ* CBS 6978 : levure sèche active,
- *Dekkera intermedia* RMWt : collection SIMI-WINERY,

- *Brettanomyces intermedius* CBS : collection Baarn,
- *Brettanomyces lambicus* Sa : isolement à partir de vins (FROUDIERE et LARUE, 1990).

Avant ensemencement, les levures *Dekkera/Brettanomyces* sont cultivées sur moût de raisin, en très large aérobiose, pendant trois jours (levains). *S.cerevisiæ* sert de levure témoin car elle est souvent utilisée dans la pratique comme levure starter lors du levurage des moûts..

Après ensemencement avec 2.10^6 cell./ml, les moûts sont mis à fermenter à 25°C dans des conditions de fermentation soit semi-anaérobies, soit aérobies ménagées permanentes (LARUE et *al.*, 1980).

Les techniques d'isolement, de dénombrement et d'identification des levures prélevées sur des raisins, dans des moûts en fermentation, des vins en cours d'élevage ou de conservation en bouteille sont décrites par FROUDIERE et LARUE en 1990.

Les acides gras pariétaux et les esters éthyliques correspondants sont dosés selon la méthode suivante : les cellules sont préalablement lavées à l'eau distillée stérile à 4°C et les lipides sont extraits par 3 fois à l'éther éthylique. 1 µl de cet extrait est injecté. Puis sur le même culot cellulaire, un broyage en présence de billes de verre (0,45 µm diamètre) est effectué. Les acides gras libres endocellulaires et leurs esters éthyliques sont extraits par trois fois à l'éther. 1 µl est alors injecté dans un chromatographe équipé d'une colonne FFAP et d'un injecteur SPLIT/SPLITLESS.

Les déterminations analytiques des vins (acidité totale, acidité volatile, acétate d'éthyle) sont réalisées suivant les méthodes décrites par RIBÉREAU-GAYON et *al.* (1982).

Les dosages du glycérol, des acides succinique et pyruvique, de l'acétaldéhyde sont effectués par méthode enzymatique (BERGMEYER, 1971).

Le dosage des substances volatiles du milieu après fermentation (méthanol, alcools supérieurs, acétates, lactate d'éthyle, acides gras à courtes chaînes et des esters éthyliques d'acides gras est réalisé en chromatographie en phase gazeuse selon les méthodes décrites par BERTRAND (1975), TORRES-ALEGRE (1982) et ZMIROU-BONAMOUR (1984).

RÉSULTATS - DISCUSSION

I — ÉTUDE ÉCOLOGIQUE DE *DEKKERA/BRETTANOMYCES*

Pour préciser la niche écologique de ces levures, nous avons recherché au cours des quatre dernières années leur présence éventuelle sur le raisin, dans des moûts en fermentation et dans des vins en cours d'élevage ou dans des vins en bouteilles.

Les populations levuriennes totales et fermentaires ont été dénombrées et identifiées à partir des raisins rouges et blancs, prélevés dans différentes appellations du vignoble de Bordeaux. Les principaux résultats sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I

Numération des levures issues de raisins prélevés dans différentes appellations de Bordeaux

Appellation	Moment du prélèvement	Nombre de baies	Volume de jus (ml)	Levures totales (cell./ml)	Levures fermentaires (cell./ml)
Graves	P1	140	160	8.000	700
	P2	145	165	30.000	8.000
Entre-Deux -Mers	P1	150	160	900	30
	P2	160	170	6.000	1.500
Saint-Emilion	P1	370	410	70	0
	P2	490	500	980	160
Médoc vignoble 1	P1	170	200	80	0
	P2	_	_	1.000	5
Médoc vignoble 2	P1	205	260	10	0
	P2	220	170	1.200	1.000
Médoc vignoble 3	P1	270	285	10	10
	P2	_	_	10	5

P1 : Prélèvement effectué 8 jours avant la récolte; P2 : Prélèvement effectué le jour de la récolte

Les populations levuriennes totales et fermentaires sont maximales en fin de maturation; leur nombre varie suivant les appellations et l'exposition des baies de raisin par rapport au soleil. La concentration en levures fermentaires est environ de 4 à 100 fois plus faible que celle des levures totales. Il est à noter qu'au moment de la récolte, la plus faible concentration trouvée est de 5 levures par ml de jus.

L'identification des clones isolés n'a jamais permis de trouver des souches appartenant au genre *Dekkera/Brettanomyces*.

L'identification des levures isolées à partir de prélèvement dans différents moûts en cours de fermentation (environ 50 échantillons) n'a jamais révélé la présence de *Dekkera/ Brettanomyces*.

Nous avons isolé deux souches de *D. intermedia* (SVL85, SE) et une souche de *B. lambicus* SA à partir d'une trentaine de prélèvements, dans des vins des régions du Médoc et de Saint-Emilion en cours d'élevage en barriques ou en cuves.

Une recherche a également été réalisée sur des vins en bouteilles (50 vins rouges, 6 vins

blancs) de différentes appellations de la région bordelaise. Le nombre de souches, les genres et les espèces isolées sont donnés dans le tableau II. Nous n'avons pas trouvé de *Dekkera*.

Dans 64 p. cent des vins rouges, la population levurienne viable est très faible (moins de 5 cellules par bouteille), dans 26 p. cent, elle est comprise entre 5 et 100 cellules par bouteille et seulement dans 10 p. cent des cas supérieure à 100 (pour 3 échantillons nous avons trouvé 1.000 cellules par bouteille).

Dans les 18 échantillons contenant plus de 5 levures par bouteille, les levures les plus fréquemment rencontrées sont *S.cerevisiæ var. bayanus* (40 p. cent) et *Candida canterelli* (35 p. cent) et loin derrière *Pichia guillemondii* (10 p. cent); les 15 p. cent restant sont représentés à égalité par *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces* et *Schizosaccharomyces pombe*. Ces genres ont été trouvés par DOMERCQ (1956), à l'exception de *Saccharomycodes ludwigii*.

Dans les 6 vins blancs secs, le nombre de levures viables est inférieur à 5 par bouteille.

A notre connaissance, *Dekkera/Brettanomyces* n'a été isolée que dans des vins blancs particuliers, notamment les vins jaunes du Jura (BARRET et *al.*, 1955).

Ainsi nous confirmons que *Dekkera/Brettanomyces* est une levure de contamination qui se trouve dans les chais et qui pourrait contaminer les moûts au cours des opérations préfermentaires ou les vins rouges en cours d'élevage (barriques usagées, opérations d'ouillage, d'assemblages ou pendant la mise en bouteilles).

II — INHIBITION DU METABOLISME DE *SACCHAROMYCES CEREVISIÆ* DANS LES MOUTS EN FERMENTATION

Nos premiers résultats (FROUDIERE et LARUE, 1990) ont montré que les levures *Dekkera* sont capables de se multiplier en présence de *S.cerevisiæ* à un taux d'ensemencement égal ou inférieur à10^6 cell./ml en donnant de mauvais goûts au vin. À un taux d'ensemencement supérieur (10^7/10^6 cell./ml), elles peuvent également inhiber très rapidement la croissance de *S.cerevisiæ* et ainsi être à l'origine d'arrêts de fermentation.

Nous avons donc tenté de rechercher le facteur qui peut être à l'origine de cette inhibition. Pour cela, compte-tenu des résultats obtenus antérieurement concernant l'inhibition de ces composés (LARUE et LAFON-LAFOURCADE, 1989), nous avons dosé les acides gras à courtes chaînes et les esters éthyliques correspondants, pariétaux et endocellulaires, chez les deux genres de levures, en fin de fermentation alcoolique.

Pour celà, un moût de raisin titrant 140 g de sucre par litre est ensemencé à raison de 2.10^6 cellules par ml de levures de genres différents et mis à fermenter.

En fin de fermentation alcoolique, les levures sont récoltées par centrifugation (5 min., 6.000 g) et après lavage des culots cellulaires, les acides gras à courtes chaînes sont dosés ainsi que les esters éthyliques correspondants, pariétaux et endocellulaires. Les résultats sont donnés respectivement dans les tableaux III et IV.

TABLEAU II
Espèces de levures rencontrées dans quelques vins en bouteilles de la région bordelaise
Anaiyses effectuées en 1991

Vins rouges			Observations microscopiques du culot de centrifugation de 10 ml de vin	Levures viables	
Appellation	Millésime	N°		Nombre cell./bouteilles	Identification des souches isolées
Haut Médoc	1986	1	Absence de levures	4	—
et Médoc	1987	2	Absence de levures	4	—
	1987	3	Quelques levures de forme ovoïde	20	*S. cerevisiæ bayanus*
	1988	4	Absence de levures	4	—
	1988	5	Absence de levures	4	—
	1988	6	Absence de levures	4	—
	1988	7	Quelques levures de forme ovoïde	10	*Candida canterelli*
	1988	8	Absence de levures	4	—
	1988	9	Absence de levures	4	—
	1988	10	Absence de levures	4	—
	1989	11	Absence de levures	4	—
	1989	12	Absence de levures	4	*S. cerevisiæ bayanus*
	1989	13	Quelques levures de forme ovoïde	20	
Listrac	1989	14	Beaucoup de levures, petites, forme ronde	10^2	*Candida canterelli*
	1989	15	Quelques levures de forme ovoïde	50	*S. cerevisiæ bayanus*
	1989	16	Absence de levures	4	—
Margaux	1987	17	Beaucoup de levures de forme ovoïde	10^2	*S. cerevisiæ bayanus*
St Estèphe	1987	18	Quelques grosses levures apiculées	20	*Saccharomyces ludwigii*
			Quelques levures, petites, forme ronde	100	*Candida canterelli*
	1987	19	Absence de levures	4	—

TABLEAU II (suite)
Espèces de levures rencontrées dans quelques vins en bouteilles de la région bordelaise
Analyses effectuées en 1991

Vins rouges			Observations microscopiques du culot de centrifugation de 10 ml de vin	Levures viables	
Appellation	Millésime	N°		Nombre cell./bouteilles	Identification des souches isolées
Moulis	1988	20	Absence de levures	4	—
Pauillac	1988	21	Absence de levures	4	—
St Emilion	1980	22	Quelques levures de forme ovoïde	15	*S. cerevisiæ bayanus*
Grand cru	1980	23	Quelques levures, petites, forme ronde	20	*Candida canterelli*
St Emilion	1980	24	Beaucoup de levures de forme ovoïde	10^2	*S.cerevisiæ bayanus*
Grand cru			Quelques levures de forme cylindrique	50	*Schizosaccharomyces pombe*
	1986	25	Quelques levures, petites, forme ronde	200	*Candida canterelli*
	1988	26	Absence de levures	4	—
	1988	27	Quelques levures, petites, forme ronde	50	*Candida canterelli*
Grand cru	1989	28	Absence de levures	4	—
Lussac	1989	29	Absence de levures	4	—
Montagne St Emilion	1989	30	Absence de levures	4	—
Lalande de Pomerol	1986	31	Absence de levures	4	—
	1989	32	Beaucoup de levures, petites, forme allongée	10	*Pichia guillemondii*
Bordeaux supérieur	1988	33	Quelques levures de forme ovoïde	50	*S. cerevisiæ bayanus*
	1989	34	Absence de levures	4	—

TABLEAU II (suite)
Espèces de levures rencontrées dans quelques vins en bouteilles de la région bordelaise
Analyses effectuées en 1991

Vins rouges			Observations microscopiques du culot de centrifugation de 10 ml de vin	Levures viables	
Appellation	Millésime	N°		Nombre cell./bouteilles	Identification des souches isolées
Bordeaux supérieur	1989	35	Beaucoup de levures, petites, forme ronde	100	*Zygosaccharomyces bailii*
Bordeaux	1988	36	Absence de levures	4	—
	1989	37	Absence de levures	4	—
	1989	38	Absence de levures	4	—
	1990	39	Absence de levures	4	—
	1990	40	Absence de levures	4	—
	1990	41	Absence de levures	4	—
1ère Côtes de Bordeaux	1989	42	Absence de levures	4	—
	1989	43	Beaucoup de levures, petites, forme allongée	100	*Pichia guillemondii*
Graves Pessac Léognan	1989	44	Absence de levures	4	—
	1989	45	Absence de levures	4	—
	1989	46	Absence de levures	4	—
	1989	47	Quelques levures, petites, forme ronde	4	*Candida canterelli*
Côtes de Bourg	1989	48	Quelques levures, petites, forme ronde	50	*Candida canterelli*
	1989	49	Quelques levures de forme ovoïde	50	*S. cerevisiæ bayanus*
Côtes de Castillon	1989	50	Absence de levures	4	—

TABLEAU II (suite)
Espèces de levures rencontrées dans quelques vins en bouteilles de la région bordelaise
Analyses effectuées en 1991

Vins blancs			Observations microscopiques du culot de centrifugation de 10 ml de vin	Levures viables	
Appellation	Millésime	N°		Nombre cell./bouteilles	Identification des souches isolées
Bordeaux contrôlée	1989	1	Absence de levures	4	—
	1990	2	Absence de levures	4	—
	1990	3	Absence de levures	4	—
Pessac Léognan	1990	4	Absence de levures	4	—
Graves	1990	5	Absence de levures	4	—
Entre-Deux-Mers	1990	6	Absence de levures	4	—

Dans les conditions de fermentation semi-anaérobies, les levures du genre *Dekkera/Brettanomyces* fixent sur leur paroi des quantités pratiquement équivalentes en ces molécules aux *Saccharomyces*. Par contre, à l'intérieur de la cellule, leurs teneurs accumulées sont respectivement 3 à 5 fois plus importantes que chez *Saccharomyces*.

Dans les conditions de fermentation aérobies ménagées permanentes, *Dekkera/Brettanomyces* présentent des teneurs fixées ou accumulées plus importantes que *S.cerevisiæ*. Les valeurs fixées sur la paroi sont respectivement multipliées par 4 à 5 et 10. À l'intérieur de la cellule, elles sont multipliées par 5 à 8 et 3 à 10. De plus, il est à noter que *Dekkera* peut fixer pariétalement ou accumuler dans son cytoplasme jusqu'à 10 fois plus d'acides gras totaux et d'esters éthyliques correspondants en aérobiose qu'en semi-anaérobiose. D'un autre côté, on ne retrouve pas dans ces conditions de fermentation (qu'elles soient aérobies ou semi-anaérobies) d'acide tétradécanoïque (C14) ni d'ester correspondant (C14C2) fixé et accumulé chez *Saccharomyces*; par contre, chez *Dekkera/Brettanomyces,* l'acide tétradécanoïque s'accumule toujours dans la cellule, en quantité plus faible que les autres et n'est fixé pariétalement que dans les conditions de fermentation aérobie.

Nous avons montré (LARUE et *al.*, 1990) que les acides gras à courtes chaînes (C8, C10, C12, C14) et les esters éthyliques correspondants (C8C2, C10C2, C12C2, C14C2) sont des inhibiteurs du métabolisme de *S.cerevisiæ*. Ainsi *Dekkera/Brettanomyces* est capable de fixer pariétalement ou d'accumuler à l'intérieur de la cellule de grandes quantités de ces substances, surtout dans les conditions d'aérobiose ménagée permanente (conditions de la vinification en rouge). On peut supposer que la levure en relargue aussi dans le milieu des quantités importantes qui inhiberont le métabolisme de *S.cerevisiæ*.

III — INCIDENCE DU DÉVELOPPEMENT DES LEVURES *DEKKERA/BRETTANOMYCES* SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES VINS

Les conditions d'expérimentation sont les mêmes que précédemment. À la fin de la fermentation alcoolique, les vins obtenus sont analysés. Les résultats sont reportés dans le tableau V.

Les vins obtenus par fermentation avec *Dekkera* présentent des acidités totales et volatiles beaucoup plus élevées, respectivement de 20 à 60 p. cent et de 134 à 700 p. cent, que ceux obtenus avec *S.cerevisiæ*, quelles que soient les conditions de fermentation sauf dans le cas de vins fermentés par *B. lambicus* qui présentent des augmentations plus faibles (respectivement 20 et 70 p. cent). Il est à noter que les acidités sont plus élevées en aérobiose et peuvent atteindre respectivement 6,4 et 2,75 g d'H_2SO_4 par litre.

Parallèlement, les concentrations en glycérol des vins fermentés avec *Dekkera* sont plus importantes dans les conditions de fermentation semi-anaérobies (30 p. cent) et deux fois plus faibles dans les conditions aérobies que ceux obtenus avec *S.cerevisiæ*.

En ce qui concerne les concentrations en acides, en acétaldéhyde et en acide pyruvique susceptibles de former des combinaisons avec l'anhydride sulfureux, les levures *Dekkera* excrètent 2 fois moins d'acétaldéhyde dans le vin que *S.cerevisiæ,* quelles que soient les conditions de fermentation et de 8 à 60 fois moins d'acide pyruvique. *B. lambicus* est la souche,

TABLEAU III

Teneurs en acides gras et esters éthyliques pariétaux chez les levures en fin de fermentation alcoolique

	Semi-anaérobiose				Aérobiose ménagée permanente			
	Saccharomyces cerevisiae* CBS 6978	*Dekkera** intermedia* RMWT	*Brettanomyces** lambicus* SA	*Brettanomyces** intermedius* CBS	*Saccharomyces* cerevisiae* CBS 6978	*Dekkera** intermedia* RMWT	*Brettanomyces** lambicus* SA	*Brettanomyces** intermedius* CBS
Acides gras								
octanoïque	47	30	24	—	64	153	328	209
décanoïque	282	110	224	87	79	350	2.158	309
dodécanoïque	38	59	53	58	16	97	323	108
tétradécanoïque	—	—	—	—	—	15	23	15
Total	167	199	301	145	159	615	2.832	641
Esters éthyliques								
octanoate	2	—	—	—	—	7	15	6
décanoate	7	4	4	—	6	26	50	25
dodécanoate	—	—	—	—	—	16	7	19
tétradécanoate	—	—	—	—	—	13	6	7
Total	9	4	4	—	6	62	78	57

sucre : 140 g/l; pH : 3,3; ensemencement : 2.10^6 cell./ml; * : levure sèche active; ** : levain de 3 jours
Les résultats sont exprimés en µg/mg du poids sec.

TABLEAU IV

Teneurs en acides gras et esters éthyliques endocellulaires chez les levures en fin de fermentation alcoolique

	Semi-anaérobiose				Aérobiose ménagée permanente			
	Saccharomyces cerevisiae* CBS 6978	*Dekkera** intermedia* RMWT	*Brettanomyces** lambicus* SA	*Brettanomyces** intermedius* CBS	*Saccharomyces* cerevisiae* CBS 6978	*Dekkera** intermedia* RMWT	*Brettanomyces** lambicus* SA	*Brettanomyces** intermedius* CBS
Acides gras								
octanoïque	28	44	—	20	49	114	658	169
décanoïque	222	849	230	397	146	594	742	678
dodécanoïque	124	604	144	458	52	311	209	329
tétradécanoïque	—	30	12	37	—	18	21	25
Total	374	1.527	386	912	247	1745	1.037	1.201
Esters éthyliques								
octanoate	13	—	—	—	5	21	5	15
décanoate	16	—	4	15	14	69	32	775
dodécanoate	17	—	—	17	9	67	14	101
tétradécanoate	—	—	—	5	—	10	15	13
Total	46	—	37	27	167	66	206	57

sucre : 140 g/l; pH : 3,3; ensemencement : 2.10^6 cell./ml; * : levure sèche active; ** : levain de 3 jours
Les résultats sont exprimés en µg/mg du poids sec.

TABLEAU V

Incidence du développement de *Brettanomyces/Dekkera* sur les déterminations analytiques des vins

	Semi-anaérobiose				Aérobiose ménagée permanente			
	*Saccharomyces cerevisiae** CBS 6978	*Dekkera intermedia*** RMWT	*Brettanomyces lambicus*** SA	*Brettanomyces intermedius*** CBS	*Saccharomyces cerevisiae** CBS 6978	*Dekkera intermedia*** RMWT	*Brettanomyces lambicus*** SA	*Brettanomyces intermedius*** CBS
Acidité totale (g/H_2SO_4 par l)	3,1	3,7	3,7	4,1	4,1	5,3	4,2	6,4
Acidité volatile (g/H_2SO_4 par l)	0,43	1,01	0,69	—	0,33	1,73	0,56	2,75
Glycérol (g/l)	3,81	4,96	4,68	4,78	3,70	1,69	1,70	1,69
Acétaldéhyde (mg/l)	16	9	8	11	24	13	17	13
Acide pyruvique (mg/l)	16	7	0,4	5	24	2	0,4	3
Acide succinique (mg/l)	349	221	236	335	488	403	247	486

sucre : 140 g/l; pH : 3,3; ensemencement : 2.10^6 cell./ml

* : levure sèche active; ** : levain de 3 jours

TABLEAU VI

Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* sur la teneur en substances volatiles des vins (mg/l)

	Semi-anaérobiose				Aérobiose ménagée permanente			
	*Saccharomyces cerevisiae** CBS 6978	*Dekkera intermedia*** RMWT	*Brettanomyces lambicus*** SA	*Brettanomyces intermedius*** CBS	*Saccharomyces cerevisiae** CBS 6978	*Dekkera intermedia*** RMWT	*Brettanomyces lambicus*** SA	*Brettanomyces intermedius*** CBS
Méthanol	5	10	8	9	6	7	4	7
Somme des alcools supérieurs (1)	18,7	16	6	4	173	92	74	95
Acétate d'éthyle	37	46	64	57	18	59	35	62
Somme des acétates (2)	2,4	—	—	—	0,1	0,3	traces	0,5
Lactate d'éthyle	1,8	1	0,8	—	—	5,0	3,6	4,8
Somme des AC (3) courts	17,8	25,0	22,4	19,3	9,4	26,2	29,4	26,5
Somme des EEAC (4) courts	2,6	0,8	1,1	0,8	1,2	3,2	3,4	2,9

sucre : 140 g/l; pH : 3,3; ensemencement : 2.10^6 cell./ml
* : levure sèche active; ** : levain de 3 jours

(1) Somme des alcools supérieurs : méthyl-2 propanol + méthyl-2 butanol + méthyl-3 butanol-1 + phényl-2 éthanol
(2) Somme des acétates : Acétate d'isoamyle + acétate de phényl-2 éthanol
(3) Somme des AC courts : acide propionique (C3) + acide butyrique (C4) + acide hexanoïque (C6) = acide octanoïque (C8) + acide décanoïque (C10) + acide dodécanoïque (C12)
(4) Somme des EEAC courts (C2) : C4C2 + C6C2 + C8C2 + C10C2 + C12C2

qui forme le moins de ces deux composés. *Dekkera* secrète l'acide succinique en quantité plus faible (jusqu'à 50 p. cent dans le cas de *B. lambicus* fermentant en aérobiose).

Ainsi *B. lambicus* SA semble avoir un métabolisme différent des autres souches; elle excrète beaucoup moins d'acides (acétique, succinique, pyruvique).

Les résultats concernant l'incidence du développement de *Dekkera* sur les substances volatiles des vins sont données dans le tableau VI.

Dans les conditions de fermentation aérobies, les levures *Dekkera/Brettanomyces* excrètent beaucoup plus d'alcools supérieurs, d'acétate d'isoamyle et de phényl-2 éthanol (absents en semi-anaérobiose), d'acides gras à courtes chaînes (de C4 à C14) (+ 30 p. cent), d'esters éthyliques (de C11C2 à C14C2) (+ 262 p. cent). De plus, elles en excrètent davantage que *S.cerevisiæ*; les teneurs en acétates sont respectivement multipliées par 3 à 5 en aérobiose. Il est à noter qu'elles forment aussi 2 à 3 fois plus d'acétate d'éthyle que *S.cerevisiæ* suivant que la fermentation s'est déroulée en semi-anaérobiose ou en aérobiose.

Par contre, les teneurs en alcools supérieurs sont diminuées quelles que soient les conditions de fermentation, d'un facteur 10 à 40 à semi-anaérobiose et 2 en aérobiose. Les concentrations en méthanol des vins sont sensiblement les mêmes pour les deux genres et restent faibles (de l'ordre de 5 mg/l). Il est à noter que *B. lambicus* se distingue toujours des autres souches par une excrétion différente de substances volatiles.

CONCLUSION

L'ensemble de nos résultats montrent que :

a) *Dekkera/Brettanomyces* est une levure de contamination, de taille et morphologie caractéristiques (petites cellules ogivales, groupées ou non par deux (FROUDIERE et LARUE, 1990); elle peut être à l'origine d'arrêts de fermentation rencontrés en vinification surtout en rouge (antagonisme *Dekkera/Brettanomyces*).

Un des facteurs à l'origine de cet antagonisme est la synthèse par *Dekkera* de quantités importantes d'acides gras à courtes chaînes (de C8 à C14) et d'esters éthyliques correspondants (C8C2 à C14C2) qui vont se fixer sur la paroi ou s'accumuler dans le cytoplasme de *S.cerevisiæ* entraînant sa mort.

De plus, par leur aptitude à se développer et à survivre aux conditions d'élevage ou de conservation des vins rouges, elle peut être à l'origine de leur refermentation.

b) *Dekkera/Brettanomyces* est aussi une levure d'altération. Nous confirmons certains résultats obtenus par DOMERQ (1956). Elles forment, surtout dans les conditions de la vinification ou de la conservation des vins rouges en concentration importante de l'acide acétique, de l'acétate d'éthyle, des acides gras à courtes chaînes de C4 à C14 et leurs esters éthyliques correspondants et en concentration plus faible du glycérol, des acides succinique,

pyruvique, des aldéhydes (acétaldéhyde). Ces modifications entraînent non seulement un déséquilibre du vin, mais aussi une altération (acidité volatile de 2,75 g/l, norme bien supérieure à la dose autorisée dans le vin pour qu'il soit marchand). Nous confirmons aussi les résultats obtenus par DE MINIAC, sur des vins de mélasses, à savoir que le métabolisme de *Dekkera/Brettanomyces* est stimulé par l'aération (effet Custer).

c) Ainsi ces levures peuvent se développer dans le moût de raisin contaminé, lors d'aération (remontages) ou dans le vin, lors de manipulation en présence d'air au cours de l'élevage en barriques avant la mise en bouteilles (assemblages) ou en cours de mise en bouteilles, surtout dans le cas des vins rouges qui ne subissent pas de mise en bouteilles stérilisante. Un moyen facile de les éviter est donc d'abord de tenir les chais et le matériel vinaire propres et désinfectés étant donné qu'il n'est pas souhaitable , pour la qualité des vins rouges, de réaliser la vinification ou la conservation en absence d'oxygène. Cependant, un autre moyen chimique pourrait être envisagé : l'addition d'acides gras à courtes chaînes à la dose de 9 mg/l en association avec l'anydride sulfureux qui permettrait d'arrêter leur développement (LARUE et FROUDIERE, 1990). Une demande d'autorisation de ces substances est en cours.

De plus, ces levures forment des concentrations très faibles en substances capables de combiner l'anydride sulfureux ce qui peut expliquer l'effet synergique important obtenu entre le couplage anhydride sulfureux et acides gras à courtes chaînes (elle est résistante à de très fortes concentrations en SO_2 (FROUDIERE et LARUE, 1990).

Manuscrit reçu le 8 juillet 1991; accepté pour publication le 18 juillet 1991.

Remerciements

Les auteurs remercient le Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux pour le financement de cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARRET A., BIDAN P. et ANDRÉ L., 1955. Sur quelques accidents de vinification dus à des levures à voile. *C.R. Acad. Agric.*, **41**,426.

BERGMEYER H.U., 1971. *Méthodes d'analyses enzymatiques.* Académie Press, New York.

BERTRAND A., 1975. Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. *Thèse de Doctorat ès Sciences.* Université de Bordeaux II.

DE MINIAC M., 1989. *Contamination of molasses alcoholic fermentations by* Brettanomyces intermedius. Issy XIII Leuven (Belgique).

DOMERCQ S., 1956. Étude et classification des levures de vin de la Gironde. *Thèse de Doctorat Ingénieur*, Université de Bordeaux II.

FROUDIERE I. et LARUE F., 1990. Conditions de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. Actualités Œnologiques 89. *Comptes-rendus du IV*ème *Symposium International d'Œnologie*. Dunod, Paris.

GALZY P. et RIOUX J.A., 1955. Observations sur quelques vins atteints par la maladie de « la fleur » dans le midi. *Progrès Agric. et Vitic.*, **144**, 365-370.

GAY R., GERMAIN P. et MICLO A., 1979. Méthodes de contrôle microbiologiques en brasserie. *Annales du Congrès Internatinal.* Apria, Paris, Tome II.

LARUE F., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environm. Microbiol.*, **29**, 4 808-811.

LARUE F. et LAFON-LAFOURCADE S., 1989. *Survival factors in wine fermentation in « Alcohol toxicity in yeasts and bacteria »*. N. Van Uden ed., CRC Press, Floride.

LARUE F., ROZES N., DOIGNON F. et FOHR L., 1990. Relation entre le métabolisme lipidique et l'activité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiæ* dans le moût de raisin. *Actualités Œnologiques 89*. Dunod, Paris.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1956. Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archiv. für Mikrob.*, **24**, 8 , 266-280.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU GAYON P. et SUDRAUD P., 1982. Analyse et contrôle des vins. *Sciences et Techniques des vins.*

SCHANDERL H. et DRACZYNSKI M., 1952. *Brettanomyces*, eine Lästige Hefegaim Flaschenvergorenent Schaumwein. *Wein und Rebe*, **20**, 462.

TORRES-ALEGRE V.M., 1982. Formation des acides gras et autres produits secondaires au cours de la vinification. Interprétation statistique des résultats. *Thèse de Doctorat Ingénieur*, Université de Bordeaux II.

ZMIROU-BONAMOUR C., 1984. Contribution à l'étude des produits scondaires de la fermentation malolactique. *Thèse de Doctorat de 3*ème *Cycle.* Université de Bordeaux II.

VERACHTER H., MARTENS H., SHANTA KUMARA H.M.C., 1989. *A very special Belgian Beer.* Issy XIII. Leuven (Belgique).