OBSERVATIONS SUR LA REFERMENTATION DES VINS LIQUOREUX BOTRYTISÉS

OBSERVATION ON THE REFERMENTATION OF SWEET BOTRYTIS-AFFECTED WINES

B. DIVOL et Aline LONVAUD-FUNEL

Faculté d'œnologie. Université Victor Segalen Bordeaux 2. UMR œnologie-ampélologie,
351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)

Résumé : Les vins blancs liquoreux français subissent parfois, au cours de leur élevage ou de leur vieillissement en bouteilles, une nouvelle fermentation non désirée par le vinificateur. Pourtant, ces vins paraissent souvent stériles d'après des contrôles microbiologiques classiques. Le travail présenté ici tente d'appréhender les caractéristiques microbiologiques et écologiques de la refermentation, de comprendre le mode de survie des levures après mutage au dioxyde de soufre, les mécanismes conduisant à la formation d'éthanal et à la refermentation. Enfin, une étude écologique post-mutage a été menée afin de mieux comprendre l'influence du SO_2 sur la survie des différentes espèces de levures en présence.

Abstract : *Botrytis*-affected wines are microbiologically unstable. Fermentation can occasionally occur during maturing time or bottle-ageing. However, wines which undergo refermentations seem to be free of yeasts. This work deals with microbial aspects and ecology of wines during alcoholic fermentation, then during refermentation. Yeast survival after stopping the alcoholic fermentation by sulphur dioxide addition is considered. Results suggest that most yeasts could survive in sweet wine under the viable but non-culturable (VBNC) state. The increase of acetaldehyde these wines in response to sulfiting is known for long time but not the conditions of its formation. In this work we show that it is probably the key of the refermentation phenomenon, through the increase of the binding power. During maturing successive cycles occur: acetaldehyde consumption, revival, death and/or new enter into VBNC state accompanied by acetaldehyde formation which increased the binding power. Then as molecular SO_2 became too low, yeasts could start a new fermentation. In this work, an ecology study was also undertaken, to understand the effect of SO_2 on yeast biodiversity. Most of the fermentative yeasts could survive especially *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces* sp., together with other yeast genera. In regard to *Saccharomyces cerevisiae* only which is often responsible for the refermentation phenomenon, this work concluded on the decrease of strain diversity to only one or two strains, in spite of the high degree of diversity during the alcoholic fermentation. The intra-species selection probably conducted to sulfite-resistant strains.

Mots clés : vins liquoreux, refermentation, SO_2, biodiversité, population viable non-cultivable
Keywords : botrytized wine, refermentation, SO_2, biodiversity, viable but non-culturable population

INTRODUCTION

Les vins liquoreux français sont issus de la vinification de raisins pourris nobles. L'attaque des raisins par le champignon filamenteux *Botrytis cinerea* induit en général la pourriture grise. Cependant, sous l'influence d'un rare microclimat, il peut envahir les raisins blancs en une pourriture qualifiée de noble, desséchant le raisin et développant des arômes singuliers. La fermentation alcoolique de ces moûts très sucrés est la plupart du temps lente et délicate. Lorqu'un équilibre correct entre la teneur en sucres résiduels et la concentration en éthanol s'établit, la fermentation est arrêtée par ajout de dioxyde de soufre à forte concentration (généralement 250 mg/L), après refroidissement du vin ou non. Le vin est ensuite élevé pendant de nombreux mois, souvent en fûts de chêne. La teneur en sucres résiduels, le pH élevé et les phénomènes de combinaison du dioxyde de soufre par de nombreuses molécules chimiques du vin (BARBE *et al.*, 2000, 2002) induisent une certaine instabilité microbiologique du vin. Au cours de l'élevage, ou durant le vieillissement en bouteilles, ces vins sont parfois victimes de nouveaux départs en fermentation, phénomènes connus sous le nom de refermentation. RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1975) ont montré que les micro-organismes responsables de ces refermentations appartenaient en général aux espèces *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* (environ 40 % des cas de refermentation), *Saccharomycodes ludwigii* et *Saccharomyces oviformis*, en raison de leur résistance au SO_2. Malgré une apparente stérilité

*Corresponding author: aline.lonvaud@oenologie.u-bordeaux2.fr

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2004, **38**, n°3, 181-190
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

du vin contrôlée par l'analyse microbiologique précédent la mise en bouteilles, des vins refermentent ; cet incident n'a jamais trouvé d'explication satisfaisante. D'autres incidents microbiologiques mettant en jeu d'autres microorganismes ont conduit à l'hypothèse de l'existence d'un état viable non cultivable (VNC) (MILLET et LONVAUD-FUNEL, 2000). Récemment, MILLS *et al.* (2002), ont montré que certaines levures fermentaires que l'on croyaient mortes, dès le début de la fermentation alcoolique des vins botrytisés, survivaient à l'état VNC jusqu'en fin de phase fermentaire. C'est notamment le cas des levures du genre *Candida*. Cette levure, déjà décrite par PEYNAUD et DOMERCQ (1959) dans les moûts de vendange botrytisée, n'avait jusqu'alors jamais été trouvée dans le vin après quelques jours de fermentation. SIPICZKI (2003) a décrit une nouvelle espèce de levure *Candida zemplinina* dans les moûts de vins botrytisés, osmotolérante et psychrotolérante, pouvant ainsi résister pendant la fermentation de ce type particulier de vin. *Candida stellata* est résistante à des concentrations de SO_2 libre importante (jusqu'à 50 mg/L) et à plus de 10 % d'éthanol (MOORE *et al.*, 1988 ; BENDA *et al.*, 1982). D'autre part, CIANI et FERRARO (1998) ont montré une interaction positive lors de l'utilisation conjointe de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Candida stellata* au cours de la fermentation alcoolique. Par ailleurs, l'intérêt organoleptique d'une fermentation réalisée à la fois par des levures du genre *Saccharomyces* et des non-*Saccharomyces* a été démontré (JOLLY *et al.*, 2003). Néanmoins, la survie de levures pendant l'élevage des vins protégés par de fortes teneurs en SO_2 libre n'a jamais été montrée que par MILLET et LONVAUD-FUNEL (2000). Cette étude, basée sur la technique d'épifluorescence, concernait les bactéries et les levures du genre *Brettanomyces*. Ces micro-organismes étaient capables de survivre dans les vins rouges à l'état viable non cultivable et de ressusciter lors des soutirages avec la dissolution d'oxygène dans le vin.

Ce travail, mené sur trois vinifications successives, a pour but de comprendre les mécanismes de survie des cellules de levure dans le vin et de suivre la dynamique et l'évolution de la biodiversité au cours de l'élevage. Enfin, l'étude des facteurs favorisant la refermentation a été envisagée afin de mieux comprendre le phénomène de la refermentation.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - LEVURES UTILISÉES ET MILIEU DE CULTURE

Des prélèvements de moûts, de vin en fermentation et en cours d'élevage ont été réalisés dans six châteaux de la région de Sauternes (France). Les levures de ces échantillons ont été dénombrées et isolées sur milieu de culture solide YPG ((1 % w/v Bacto™ yeast extract (Fisher Scientific Labosi, Elancourt, France), 2 % w/v casein pepton (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), 2 % w/v D-glucose Rectapur (VWR), 30 g/L Bacto™ agar (Fisher Scientific Labosi). Le pH du milieu a été ajusté à 5,0 par ajout de HCl . Du Biphenyl (Acros organics, Noisy-le-Grand, France) (0,015 % dilué dans l'éthanol) a été ajouté pour prévenir le développement de champignons filamenteux, et du chloramphenicol (Calbiochem, San Diego, CA, USA) (0,01 % dilué dans l'éthanol) pour inhiber le développement des bactéries. Les boîtes de Petri sont incubées entre 3 et 10 jours à 25 °C selon les espèces de levures et le stade de vinification.

Pour certaines expériences particulières, des levures commerciales appartement à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées : ZymafloreST (Laffort, Bordeaux, France), Maurivin PDM, Levuline BRG et UCD 522.

II - . L'OBSERVATION DES CELLULES PAR ÉPIFLUORESCENCE

L'épifluorescence est une technique de microscopie, déjà décrite pour son application en microbiologie du vin par FROUDIERE *et al.* (1990) pour le dénombrement des micro-organismes. La méthode développée par Chemunex (Ivry-sur-Seine, France) consiste à retenir par filtration les micro-organismes du vin sur une membrane (Chemfilter CB04). Les cellules sont ensuite incubées en présence de 5,5 µL d'acétate de fluoresceine (ChemChrome V6) et de 550 µL d'un tampon de réaction (ChemSol B16). Après action du diacétate de fluoresceine pendant 30 min à 30 °C dans le noir, la membrane, placée entre lame et lamelle, est observée au microscope Olympus (Rungis, France) BX51, en utilisant un grossissement de 1000 et un éclairage aux ultraviolets, générés par une lampe au mercure au travers d'un filtre vert interférentiel (Olympus, ref. 467803). Les cellules vivantes, possédant une activité enzymatique, dégradent ce substrat en un produit fluorescent sous ultraviolets.

Cette technique permet de compter les cellules vivantes à la surface de la membrane, de mesurer leur intensité de fluorescence et leur taille, grâce au logiciel Olympus-DP-Soft.

III - MESURE DE LA CONCENTRATION EN ÉTHANAL DES VINS

La teneur en éthanal des vins a été mesurée au cours de l'élevage grâce à la méthode enzymatique de Boehringer Mannheim (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) en suivant les instructions fournies dans le kit.

IV - CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES SOUCHES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

La discrimination entre les différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* a été réalisée par l'obtention d'un profil, résultant de l'amplification des séquences interd, en utilisant la méthode décrite par LEGRAS et KARST (2003). La PCR est réalisée directement à partir des colonies de levures, sans extraction préalable de l'ADN. Pour cela, quelques cellules sont mises en suspension dans 20 µL d'eau pour préparation injectable (ppi) et chauffées à 95 °C pendant 10 min. Le Custom Made PCR Master Mix (QBiogene, Illkirch, France) comprenant 10 mmol l^{-1} Tris-HCl, pH 9; 50 mmol l^{-1} KCl; 0,1 % triton X100; 0,2 mg ml^{-1} BSA; 3,12 % glycerol; 1,5 µmol l^{-1} MgCl2; 200 µmol l^{-1} de chaque dNTP; 0,1 U.μl^{-1} Taq DNA-polymerase) est ensuite ajouté à raison de 4 µl pour un volume final de 50 µl final volume. Les amorces d12 et d21 sont utilisées à la concentration de 0,2 µM.

V - IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE LEVURES

L'identification de colonies isolées a été réalisée en utilisant la méthode de PCR-RFLP décrite par ESTEVE-ZARZOSO *et al.* (1999). La PCR est réalisée directement à partir de colonies selon le protocole décrit plus haut, grâce aux amorces ITS1 et ITS4 et selon le programme PCR décrit par ces auteurs. La digestion de 10 µL d'amplicon est réalisée distinctement par les enzymes suivantes : *Hha*I, *Hae*III et *Hin*fI (New England Biolabs, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les tailles des amplifiats PCR et des bandes issues des différentes digestions sont comparées avec celles données dans la base de données (ESTEVE-ZARZOSO *et al*., 1999).

VI - EXTRACTION ET ANALYSE PAR PCR-DGGE DE L'ADN DES LEVURES DU VIN

L'ADN est extrait directement du vin sans culture préalable selon la méthode d'AUSUBEL *et al.* (1995) adaptée. On obtient ainsi l'ADN en mélange de tous les micro-organismes du vin. 10 mL de vin sont centrifugés à 5 300 g pendant 5 min. On récupère le culot de cellules qui est repris dans un tampon de lyse (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) et 200 µL de billes de verre (0,4 mm de diamètre) sont ajoutés ainsi que 200 µL d'un mélange phenol / chloroform / isoamylic acid (25:24:1). Le tube est agité au vortex pendant 3 min et 200 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) sont ajoutés. Après centrifugation pendant 3 min à 16 400 g, 1 mL d'éthanol absolu est ajouté au surnageant. Après mélange par retournement du tube. On centrifuge à 16 400 g pendant 5 min. Le culot est dissous dans 400 µL de TE, additionné de 1 µL de RNase (RnaseA, DNase free, Qbiogene), puis incubé pendant 5 min à 37°C. 40 µL d'acérate de sodium et 1 mL d'éthanol absolu sont ajoutés. Le tube est mélangé par inversion, puis centrifugé pendant 3 min à 16 400 g. Le culot d'ADN est séché sous vide pendant 15 min, puis dissous dans de l'eau ppi stérile.

L'ADN est ensuite purifié grâce au Geneclean kit de Qbiogene en suivant les instructions du fabricant.

L'ARN total des levures du vin a été extrait en utilisant le FastRNA® Pro Red Kit (Qbiogene). 10 mL de vin sont centrifuges pendant 5 min à 10 000 g. Le culot de cellules est lavé une fois avec de l'eau traité au DEPC (Sigma, L'Isle d'Abeau, France), puis centrifugé à 10 000 g pendant 5 min. Pour cette extraction, réalisée selon les instruction du fabricant, l'utilisation du Fastprep FP120 instrument est requise.

Les contaminations en ADN sont éliminées en utilisant le kit DNA-free (Ambion Inc, Austin, TX, USA). 10 µL d'ARN sont ajoutés à 2 µL de tampon de réaction, 1 µL DNase et 7 µL d'eau dépourvue de RNase. L'action de la DNase est réalisée à 37 °C pendant environ 2 heures. 5 µL de tampon d'inactivation de la DNase sont ensuite ajoutés et on laisse agir à temperature ambiante pendant 2 minutes. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 1 minute, les surnageants sont placés dans la glace. L'absence de contamination en ADN est vérifiée par PCR directement sur les extraits. Dans le cas où une amplification serait visualisée, un nouveau traitement à la DNase est réalisé.

L'étude de l'écologie levurienne du vin a été réalisée par PCR-DGGE ou RT-PCR-DGGE en amplifiant la région variable D1 de l'ARNr 26S, comme décrit par COCOLIN et MILLS (2003). Pour la PCR-DGGE, 1 µL d'ADN sert de matrice pour un volume final de 50 µL de réaction. Pour la RT-PCR-DGGE, l'ARN total est d'abord retro-transcrit en ADNc en utilisant le iScript™ cDNA Synthsis kit (Biorad, Hercules, CA, USA). 15 µL d'ARN pur sont ensuite ajoutés à 4 µL de 5X iScript reaction mix et 1 µL de iScript Reverse Transcriptase. La réaction est réalisée à température ambiante pendant 5 min, puis pendant 30 minutes à 42 °C. Enfin, l'inactivation de l'enzyme est réalisée par un passage de 5 min à 85 °C. Les échantillons sont ensuite stockés dans la glace. 4 µL de ce mélange sont utilisés pour la PCR dont le volume final de réaction, comme précédemment de 50 µL. Les amorces NL1 (additionné d'un GC-clamp) et LS2 sont également utilisées à la concentration de 0,2 µM.

RÉSULTATS

I - CARACTÉRISTIQUE MICROBIOLOGIQUE D'UNE REFERMENTATION

Quatre cas de refermentations en barriques, intervenues au cours de l'élevage des vins, ont été étudiés. Il s'agit toujours de vins ayant terminé leur fermentation

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

alcoolique depuis plusieurs mois (entre 4 et 16 mois). Dans tous les cas, la teneur en SO_2 libre avait chuté à des valeurs faibles (0 à 18 mg/L). A l'inverse, la teneur en éthanal de ces vins était très élevée (souvent autour de 120 mg/L). Bien que le vin fermente, les populations de levures dénombrées sur milieu de culture solide proches de 10^4 UFC/mL étaient beaucoup plus faibles que les populations au cours de la fermentation alcoolique initiale. Dans tous ces cas étudiés, les levures responsables de ces refermentations ont été identifiées par PCR-RFLP comme appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

Parmi ces quatre cas de refermentations, deux ont été plus particulièrement étudiés.

Le premier est la refermentation quatre mois après la fermentation alcoolique d'un lot dont la population levurienne avait été suivie dès le début de la vinification et après le mutage. La figure 1 présente l'évolution des profils génétiques, des biomasses récupérées sur boîte de Petri. La première date correspond au jour du mutage et la dernière au cours d'une refermentation avérée. Au cours du temps, une évolution du mélange des souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est clairement visible, même pendant la période précédent l'incident. Puis la (les) souche(s) de refermentation (piste 5) présente(nt) un profil bien distinct de celui ayant réalisé la fermentation initiale (piste 1).

Le second cas étudié correspond à une refermentation plus tardive (dix mois après la vinification). Le lot subissant cet incident d'élevage est le résultat de l'assemblage de trois lots ensemncés respectivement par ZymafloreST, levuline BRG, Maurivin PDM et un lot non ensemencé ayant subi une fermentation par la flore indigène. La diversité des souches lors de la fermentation initiale a été comparée avec celle de la refermentation. Les pourcentages de chaque souche de levure *S. cerevisiae* dénombrés pendant la fermentation et la refermentation ont été reportés pour le lot non ensemencé sur le tableau I. Deux conclusions s'imposent. D'une part, la fermentation alcoolique dans le lot non ensemencé est réalisé par un grand nombre de souches différentes, alors qu'on ne retrouve plus que deux de ces souches lors de la refermentation, dont une très largement majoritaire. D'autre part, les souches de refermentation sont des souches indigènes et non commerciales (non montré). Ces deux exemples montrent que la refermentation est réalisée par un nombre de souches très limité, avec un nombre total de cellules restreint, contrairement à la fermentation alcoolique initiale.

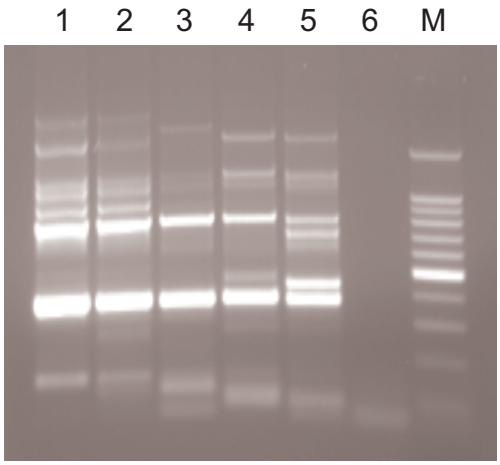


Figure 1 – Exemple d'évolution de la microflore levurienne depuis la fermentation jusqu'à l'incident de refermentation.
Piste 1 : 29 octobre (avant mutage). Piste 2 : 31 octobre (juste après mutage). Piste 3 : 8 novembre. Piste 4 : 17 décembre. Piste 5 : 12 mars (en refermentation). Piste 6 : Témoin négatif de PCR. Piste M : Marqueur de taille 100 bp (Promega).

Yeast microflora evolution from alcoholic fermentation to refermentation.
Lane 1 : 29th october (berfore SO2 addition). Lane 2 : 3th of october (just after SO2 addition). Lane 3 : 8th of november. Lane 4 : 17th of december. Lane 5 : 12th of march (during refermentation). Lane 6 : negative control. Lane M : size maker Promega (100 bp)

Tableau I – Diversité comparée entre un lot en fin de fermentation et le même subissant une refermentation, dix mois plus tard.
A à G : types de profil génétique (régions interδ) de levures indigènes.

Diversity comparison between two samples of the same wine at different stages : during alcoholic fermentation and ten month later during refermentation.
A to G : indigenous yeast strains genetic fingerprints (interδ regions)

Type de profil	A	B	C	D	E	F	G
Pourcentage rencontré au cours de la fermentation alcoolique	36,5	28,6	15,9	9,5	4,8	3,2	1,5
Pourcentage rencontré au cours de la refermentation	0	98,8	0	0	0	1,2	0

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

II - LE DEVENIR DES LEVURES APRÈS MUTAGE

Les lots étudiés à titre d'exemple ci-dessus présentaient une stérilité apparente depuis les semaines suivant le mutage jusqu'à l'incident de refermentation. La stabilité semblait assurée d'après les contrôles réguliers effectués par culture sur milieu solide d'échantillons prélevés au cœur de la barrique. La réapparition de souches de levures présentes pendant la fermentation initiale au moment de l'incident ne saurait pourtant être due au hasard. L'étude du devenir des levures après le choc du mutage a donc été menée. Deux années de suite, la microflore de différents lots de vins (10 la première année et 6 la seconde) de six châteaux distincts de la région de Sauternes a été suivie à partir du moût, juste après débourbage et entonnage, jusqu'aux trois premiers mois d'élevage pour la plupart, voire jusqu'après 15 mois d'élevage pour certains. Pour chaque lot et chaque prélèvement, une mise en culture sur boîte de Petri a été systématiquement comparée à une observation par microscopie sous épifluorescence. La figure 2 présente l'évolution de la population levurienne d'un lot sur quinze mois. Le nombre de levures présentes pendant la fermentation est identique quelle que soit la méthode utilisée. En revanche, le mutage marque le début d'une différence nette. Alors que le nombre de cellules encore capables de former des colonies chute à zéro rapidement, le nombre de levures fluorescentes, donc effectivement vivantes chute lentement puis se stabilise aux alentours de 10^4 cellules/mL, malgré les soutirages successifs (tous les trois mois environ).

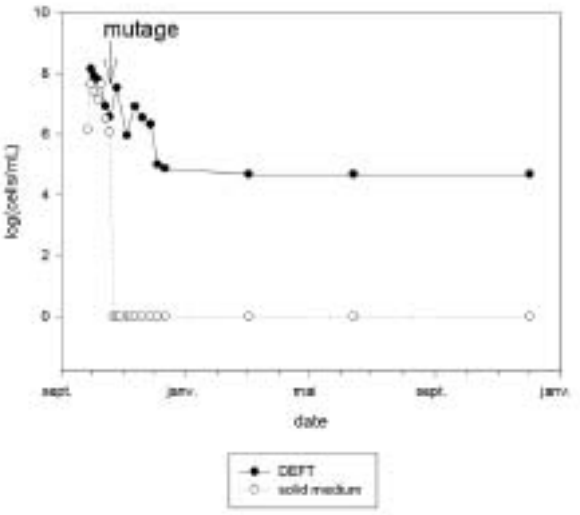


Figure 2 – Exemple de dénombrement des levures totales après mutage selon deux méthodes : l'étalement sur milieu de culture solide et l'épifluorescence pendant 15 mois.

Fifteen month yeast counting after SO_2 addition using two methods : plate counting and direct epifluorescence technique

Nous avons exploité tous les apports de l'observation microscopique sous épifluorescence. Elle permet non seulement de dénombrer le nombre de cellules vivantes, mais également par traitement des images, de noter la morphologie des cellules et mesurer leur taille. D'autre part, leur vitalité peut être appréciée globalement par la mesure de l'intensité de fluorescence. En effet, la fluorescence des cellules étant le résultat d'une activité enzymatique, on peut corréler, l'intensité de fluorescence à l'état de vitalité. Dans les échantillons analysés, les cellules semblent se déformer (non montré), leur taille et leur intensité de fluorescence chutent assez rapidement après mutage (tableau II), traduisant l'entrée de ces cellules dans un certain état de résistance : baisse des activités métaboliques, réduction de la surface d'échange avec le milieu extérieur.

III - DIVERSITÉ DES LEVURES PENDANT L'ÉLEVAGE

La découverte de la survie des levures dans le vin a suggéré une étude écologique de ces vins après le mutage. L'obstacle essentiel était l'absence de formation de colonies sur milieu de culture classique. Ce problème a été contourné en procédant à l'extraction directe de l'ADN des levures sur le vin, sans préculture, expérience déjà tentée avec succès par divers auteurs (GINDREAU *et al.*, 2001 ; FERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2001 ; PLAZA *et al.*, 2001 ; MILLS *et al.*, 2002).

Un essai a été conduit en vue d'établir l'impact de la teneur en SO_2 actif au moment du mutage sur les levures de la fermentation alcoolique (figure 3). Un vin, fermenté en fût de chêne, a été muté après fermentation alcoolique de manière à obtenir une teneur en SO_2 actif de 0,26 mg/L dans un lot et de 0,37 mg/L dans un second. Dans les deux lots, les profils obtenus par amplification de l'ADN sont identiques, quarante-deux jours après mutage. En revanche, l'amplification de l'ARN montre que dans le second lot, le nombre d'espèces de levures vivantes a chuté. Les amplifiats ont été séquencés pour l'identification. Si un certain nombre d'espèces subsistent dans ces vins (*Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula sloofiae*, *Candida cantarelli*), d'autres ne parviennent pas à survivre (*Hanseniaspora sp.*, *Dekkera bruxellensis*, et les champignons tels que *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp.). Dans d'autres lots suivis (résultats non montrés), l'espèce *Dekkera bruxellensis* et les champignons *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. parviennent à survivre lorsque la dose de dioxyde de soufre utilisée au mutage ne permet pas à la concentration en SO_2 actif de dépasser 0,35 mg/L. Cependant, dans tous les cas, les levures apiculées (*Hanseniaspora* sp., *Pichia* sp.) ne parviennent jamais à survivre.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

VI - COMPORTEMENT DES LEVURES AU COURS DE L'ÉLEVAGE

La teneur en SO_2 actif maintenue au cours de l'élevage des vins liquoreux a un rôle fondamental et permet l'élimination d'un certain nombre d'espèces de levures, en particulier les non-fermentaires, mais, d'autres survivent notamment *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces* sp. (RIBÉREAU-GAYON *et al*., 1975). L'expérience suivante a été menée dans le but de comprendre quels facteurs permettent aux cellules de levure de recouvrer leur capacité à se multiplier. L'expérience se divise en deux parties : la première permet de mesurer l'effet du SO_2 actif et la deuxième l'influence de la fréquence d'aération. Chacune a été menée au chai, en barrique, dans deux châteaux distincts de la région de Sauternes. Les expérimentations ont duré six mois et pour tous les prélèvements, la capacité à former des colonies sur milieu de culture solide a été contrôlée. La concentration en éthanal a été mesurée régulièrement.

Deux lots de vins ont été ajustés à différentes teneurs en SO_2 libre (de 25 à 45 mg/L) et à deux pH (de 3,60 à 4,00), faisant ainsi varier la concentration en SO_2 actif entre 0,16 et 0,73 mg/L. Les pH ont été ajustés par ajout d'acide tartrique ou de bitartrate de potassium. Deux autres lots de vin ont été aérés avec des fréquences différentes pour mesurer l'effet de l'oxygène sur les levures. Ainsi,

Tableau II – Exemple d'évolution de la taille et de l'intensité de fluorescence des cellules après mutage

(* : valeur significativement différente (P<0,01) de la précédente)

Cell size and fluorescence intensity evolution of yeast cells after SO_2 addition

(* : significatively different value (P< 0.01) from the previous)

	Intensité de fluorescence (unite arbitraire)		Taille des cellules (µm)	
	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type
Avant mutage	4,64	0,63	6,14	1,00
1 jour après mutage	2,28*	0,74	4,75*	1,13
6 jours après mutage	1,54	0,12	4,55	1,09
13 jours après mutage	1,45*	0,14	3,04*	0,90
20 jours après mutage	1,62*	0,13	3,38	0,48

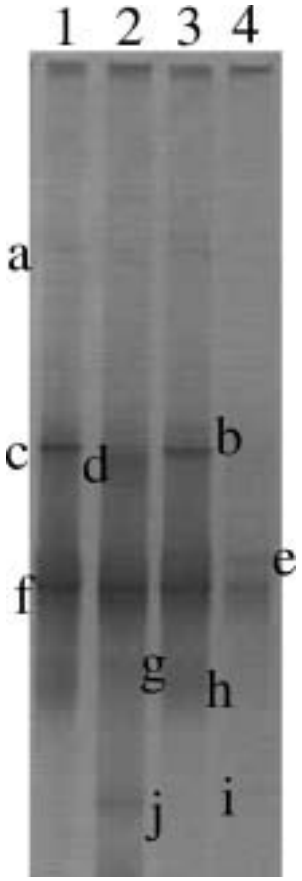


Figure 3 – DGGE réalisée après amplification par PCR de la région D1 de l'ARNr 26S des différentes levures en mélange coexistant dans le vin 42 jours après mutage, sur un lot de vin après mutage muté avec deux doses de SO_2 différentes.

Les pistes 1 et 2 montrent le résultat de la DGGE après un mutage permettant d'obtenir 0,26 mg/L de SO_2 actif, les pistes 3 et 4 une teneur de 0,37 mg/L de SO_2 actif. Pour les pistes 1 et 3, la matrice utilisée pour la PCR est l'ADN des levures, extrait directement sur le vin. Pour les pistes 2 et 4, la matrice est l'ADNc obtenu par rétro-transcription de l'ARN des levures, extrait directement sur le vin. a à k : bandes découpées, réamplifiées par PCR et identifiées par comparaison de séquences. a : *Hanseniaspora* sp. ; b : *Armillaria* sp. ; c : *Aureobasidium pullulans* ; d : *Rhodotorula sloofiae* ; e : *Candida cantarelli* ; f : *Saccharomyces cerevisiae* ; g et h : *Dekkera bruxellensis* ; i : *Penicillium* sp. ; j : *Aspergillus* sp.

26S rRNA D1 region DGGE yeast fingerprints from two batches of wines which were added with different SO_2 concentrations.

Lanes 1 and 2 : 0,26 mg/L active SO_2. Lanes 3 and 4 : 0.37 mg/L active SO_2. Lanes 1 and 3 : The PCR template was directly extracted global yest DNA. Lanes 2 and 4 : PCR template was RNA. a to k : excised bands which were PCR-reamplified and identified by sequence comparison

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

certaines barriques ont été entonnées sans aération et non aérés dans la suite, d'autres ont été entonnées avec aération mais non soutirées ensuite, d'autres ont été soutirées tous les mois et enfin, certaines ont été soutirées tous les quinze jours. La figure 4 présente l'évolution conjointe de la teneur en éthanal et de la population cultivable au cours des six mois suivant l'entonnage pour les deux expériences (la figure présente seulement une modalité par expérience). La teneur en éthanal des vins et la population fluctuent au cours du temps. Globalement, elle augmente au cours du temps pour les vins dont la teneur en SO_2 actif est inférieure à 0,32 mg/L. À la fin de l'expérimentation, les vins ayant la plus petite teneur en SO_2 actif ont la plus forte teneur en éthanal et inversement (résultat non montré). Concernant l'aération, la teneur en éthanal est d'autant plus élevée que l'aération est fréquente. Pourtant, en fin d'expérimentation, les vins aérés tous les mois ou seulement lors de l'entonnage subissent une augmentation d'éthanal importante.

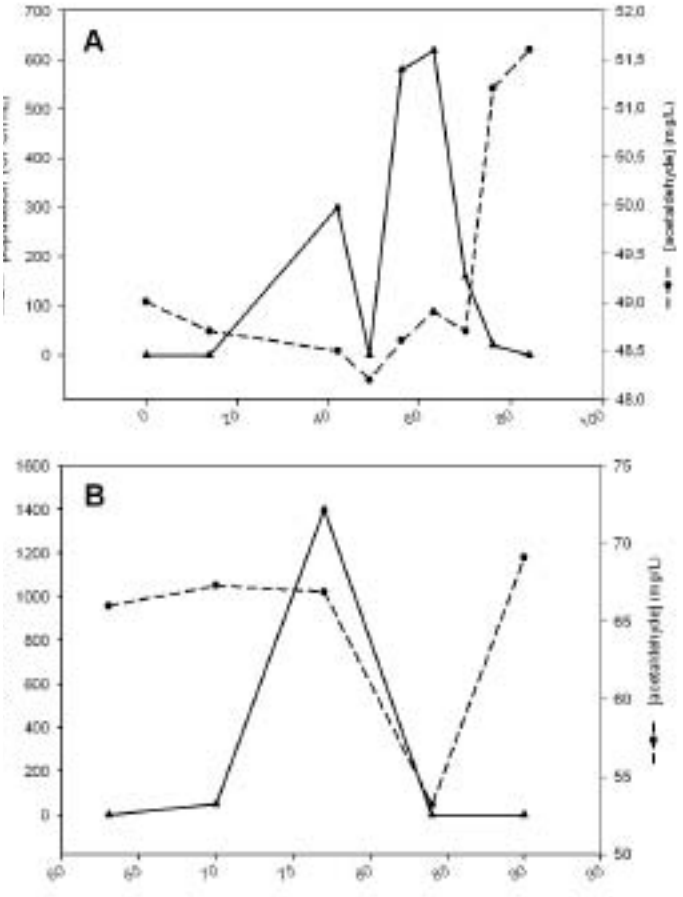


Figure 4 – Exemples d'évolution de la teneur en éthanal et de la population levurienne cultivable pour deux expérimentations relatives à l'influence de la teneur en SO_2 actif (A) et à l'influence de la fréquence d'aération (B).

Les valeurs portées en abscisse de chaque graphique représentent le nombre de jours écoulés depuis le début de l'expérience. Seule une partie représentative révélant un (B) ou deux (A) cycles de résurrection est présentée. Pour le graphique A, c'est le lot dont la teneur en SO_2 actif a été maintenue à 0,32 mg/L qui est montré. Pour le graphique B, est présenté le lot aéré le plus fréquemment.

Influence of active SO_2 concentration (A) and aeration frequency (B) on acetaldehyde concentration and culturable yeast counts.

A: wine batch where 0.32 mg/l active SO_2 was maintened. B: the most aerated batch.

L'aspect irrégulier des courbes semble à première vue anarchique, cependant, la figure 4 montre qu'il n'en est rien. En fait, les teneurs en éthanal et la population cultivable semblent étroitement liées. En effet, au cours du temps, se succèdent des cycles : chute de la teneur en éthanal, croissance des levures, chute de la teneur en éthanal, chute de la population de levures, augmentation de la teneur en éthanal (en général à un niveau supérieur à celui du début de cycle, et d'autant plus que la population de levures a été élevée et la durée de vie longue), et ainsi de suite, de manière plus ou moins régulière. Ainsi, la teneur en éthanal augmente progressivement.

DISCUSSION

L'instabilité microbiologique des vins liquoreux est connue depuis longtemps. Les moyens classiquement mis en œuvre pour contrôler les levures de refermentation sont le maintien d'une teneur en SO_2 libre conséquente (aux alentours de 50 mg/L), d'une température fraîche et le méchage systématique des barriques avant entonnage. Avant mise en bouteilles, une filtration stérile ainsi qu'un embouteillage à chaud ou même une pasteurisation peuvent être envisagés. Néanmoins, pour des raisons organoleptiques, ces dernières solutions sont rarement exploitées. La présence de levures capables de reprendre une fermentation au cours de l'élevage, ou même au cours du vieillissement en bouteilles, alors que ces vins paraissent stériles après contrôle microbiologique classique (mise en culture sur milieu solide) a conduit à l'étude présentée ici. Dans la barrique, les levures peuvent coloniser tout l'espace, du fond à la surface. Cependant, après le mutage, on note classiquement un plus grand nombre de cellules dans le fond de la barrique ; celles-ci sont périodiquement éliminées par soutirage. La présence de levures dans les interstices du bois est également envisageable. Dans les expériences envisagées, les prélèvements ont été réalisés au cœur de la barrique. PEYNAUD et LAFOURCADE (1952) notaient déjà l'effet du mutage sur l'activité et la localisation des levures dans les barriques. En effet, suite aux mutages, «la fermentation est (…) arrêtée, les levures sont tombées au fond du récipient et le vin s'est éclairci. Le dosage du sucre ne permet pas de constater une diminution sensible de ce corps pendant ce même laps de temps et, d'autre part, il semble qu'il reste suffisamment d'acide sulfureux libre pour bloquer tout métabolisme fermentatif des

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

levures. Malgré tout, les levures ne sont pas tuées, elles restent plus ou moins actives et cette activité se traduit par une formation d'éthanal. Tout se passe comme si les levures étaient capables de créer ainsi autour d'elles dans le liquide, une zone exempte d'antiseptique dans laquelle elles continuent à se reproduire insensiblement et à fermenter le sucre. Ces auteurs préconisaient donc d'éliminer les levures par sédimentation (débourbage) avant de réaliser le mutage avec des doses importantes de dioxyde de soufre. Ils observaient la faible (sinon l'absence de) mortalité des levures confrontées au stress SO_2 libre ; ces levures répondant par une activité métabolique réduite, avec une fermentation résiduelle quasi indétectable, mais une formation d'éthanal mesurable. En fait, nos travaux démontrent que les levures survivaient effectivement bien dans les vins liquoreux après mutage, même en cas de débourbage, sous une forme particulière qui empêche leur croissance en milieu de culture classique. Le vin paraît donc stérile après une analyse microbiologique classique. Cet état de résistance particulier a été déjà révélé par un certain nombre d'auteurs en particulier chez les bactéries d'autres environnements (XU *et al*., 1982 ; OLIVER, 1993), avec les changements physiologiques mis en évidence dans ce travail : diminution de la taille des cellules (MCDOUGALD *et al*., 1998), diminution de l'activité métabolique (OLIVER, 1993). Cet état de survie si particulier, nommé état viable non cultivable (VNC), a été récemment mis en évidence pour les bactéries du vin et pour les levures du genre *Brettanomyces* (*Dekkera*) par MILLET et LONVAUD-FUNEL (2000). La possibilité de sortie de cet état a été mise en évidence dans des conditions de laboratoire dans de précédents travaux (DIVOL and LONVAUD-FUNEL, 2004, soumis pour publication) pour des espèces telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces bailii*. Cette revivification peut être directement suspectée comme étant la clef du phénomène de refermentation. D'autre part, une étude de l'écologie levurienne des vins en fermentation et en refermentation a été menée. FREZIER (1992) a déjà montré que, dans des conditions de fermentation délicate, un grand nombre de souches de *Saccharomyces cerevisiae* coexistent dans le vin et qu'elles se succèdent au cours de la fermentation alcoolique. Les vins liquoreux étant très riches en sucres et les fermentations particulièrement lentes, on vérifie dans ce travail qu'effectivement de nombreuses souches existent. Au cours de la refermentation, le nombre de souches se réduit considérablement. La population est quasi monoclonale, ce qui suggère un potentiel d'adaptabilité de la souche de refermentation (qui n'était pas la souche majoritaire de la fermentation alcoolique initiale) aux conditions très difficiles des vins liquoreux : pression osmotique élevée, teneur en SO_2 libre élevée, teneur en éthanol élevée…

Au cours de l'élevage, une série de cycles se succède, expliquant ainsi les variations de la teneur en éthanal au cours du temps, ainsi que les variations de la population levurienne, fluctuant entre zéro levure cultivable et 10^4 UFC/mL. Cette observation permet d'élaborer un scénario de la reprise de fermentation. En conditions d'élevage souple (teneur en SO2 actif inférieure à 0,35 mg/L, fréquence d'aération élevée), la population résiduelle (à l'état VNC) pourrait consommer de l'éthanal, ce qui engendre leur résurrection partielle avec multiplication cellulaire et donc augmentation du nombre de levures cultivables. Les conditions du milieu n'étant pas encore favorables, une grande partie des cellules formées meurent, laissant quelques cellules à l'état VNC, remplaçant et/ou s'ajoutant aux premières et formant ainsi la nouvelle population résiduelle VNC. À chaque mort des cellules, un relargage d'éthanal se produit avec augmentation du pouvoir de combinaison, la teneur en éthanal relarguée étant en général supérieure à celle consommée par les levures. Des cycles se succèdent ainsi, la concentration en éthanal augmentant au fur et à mesure. Le vin est dans un équilibre microbiologique de plus en plus précaire. La moindre chute de la teneur en SO_2 libre aux alentours de 10 à 20 mg/L (soit généralement une teneur en SO_2 actif en dessous de 0,15 mg/L) est suivie par une plus grande multiplication cellulaire. Cependant, la plupart des refermentations se déclenchent avec une population faible aux alentours de quelques dizaines de milliers d'UFC/mL, mais une activité importante, d'où le dégagement gazeux observé. Les levures qui parviennent ainsi à sortir de leur état VNC sont toujours des levures dont la résistance au dioxyde de soufre est bien connue : *Zygosaccharomyces* sp. et certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

La diversité levurienne des vins liquoreux a été étudiée dans ce travail. Plusieurs espèces survivent dans le vin, notamment les levures fermentaires, mais également quelques levures oxydatives (du genre *Rhodotorula*). Selon le stade d'évolution de l'élevage et selon le vin, les souches évoluent les unes par rapport aux autres et que des cycles se succèdent. Au cours de l'élevage, il fallait une méthode d'identification permettant de s'abstenir de pré-culture. La PCR amplifie les acides nucléiques (ADN ou ADNc) des espèces en mélange introduit un biais incontournable. En effet, les acides nucléiques des espèces majoritaires sont amplifiés fortement, masquant ainsi les espèces minoritaires. Il est donc difficile d'établir un catalogue exhaustif des espèces en présence. Ce phénomène explique l'apparition soudaine de plusieurs espèces de levures sur les gels de DGGE après de longs mois d'élevage, alors que pendant les premiers mois, seules les espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida stellata* était révélées. D'autre part, avec le temps, il est envisageable que la population de chaque espèce s'uniformise plus ou moins, avec notamment une nette diminution, des deux espèces précitées. La PCR-DGGE constitue néan-

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

moins un outil puissant dans la détection des levures du vin. Mais elle est basée sur l'amplification de l'ADN du vin et on ne sait pas s'il s'agit d'ADN libre dans le vin ou d'ADN de levures mortes non autolysées. Le recours à la RT-PCR-DGGE a donc été proposé. Basée sur l'ARN, elle a permis de détecter uniquement des levures vivantes. On peut ainsi faire une comparaison entre les levures réellement vivantes et les levures mortes, dont on ne détecte plus que de l'ADN résiduel. Finalement, la plupart des levures détectées par PCR-DGGE sont réellement vivantes. Seule la détection d'ARN de *Hanseniaspora* sp. et *Dekkera bruxellensis* est impossible, quand les teneurs en SO_2 actif supérieures à 0,35 mg/L. La disparition d'*Hanseniaspora uvarum* au cours de la fermentation des vins liquoreux a d'ailleurs déjà été mise en évidence par COCOLIN et MILLS (2003). En revanche, les autres levures (*Saccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp.,…) parviennent à survivre, même si seuls les deux premiers genres cités sont capables de ressusciter de l'état VNC et donc de refermenter.

CONCLUSION

Les vins liquoreux sont des vins fortement sucrés. Leur élevage en fût de chêne (donc sous oxygénation ménagée permanente) dure souvent couramment jusqu'à deux ans. Leur pH est très élevé. Tous ces facteurs sont défavorables à une bonne stabilisation microbiologique du vin. De nombreuses espèces de levures fermentaires (parmi lesquelles *Saccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp.) parviennent en effet à survivre à l'état viable non cultivable en nombre relativement élevé (jusqu'à 10^4 cellule/mL) quelle que soit la dose de SO_2 utilisée au moment du mutage. Au cours de l'élevage, des cycles successifs de résurrection, puis de mort d'une partie de la microflore, semblent se succéder, provoquant une augmentation irrégulière mais irrémédiable de la teneur en éthanal des vins. Or, cet aldéhyde est l'une des principales molécules combinant le SO_2 libre contribuant ainsi à augmenter progressivement le pouvoir de combinaison du vin. La moindre négligence du vinificateur dans le maintien d'une dose raisonnable de dioxyde de soufre mène irrémédiablement à la refermentation. La dose de 0,35 mg/L de SO_2 actif pendant l'élevage semble la valeur charnière entre une situation sûre et une plus risquée. En effet, l'ensemble de l'étude conduit à montrer qu'en deçà de cette valeur, la stabilité microbiologique n'est plus. Une étude plus approfondie de ces levures, et surtout des souches de levures de *Saccharomyces cerevisiae*, survivant dans le vin après de longs mois d'élevage est désormais en cours afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'adaptation, notamment vis-à-vis du SO_2. Une autre voie pour limiter les risques de refermentation pourrait passer par l'utilisation d'un autre fongicide au moment du mutage. Dans cette idée, et aussi pour tenter de diminuer les doses de dioxyde de soufre utilisés dans les vins liquoreux, une étude a été menée sur la possible utilisation du diméthyldicarbonate au moment du mutage (DIVOL et LONVAUD-FUNEL, 2003). La comparaison de l'effet de ce fongicide et du SO_2 sur la mortalité des levures semble prometteur quant à la survie des cellules au cours de l'élevage.

Remerciements : Les auteurs adressent leurs remerciements au Syndicat des crus classés de Sauternes et de Barsac ainsi qu'au Château d'Yquem pour leur soutien financier. Ils saluent également la participation des six châteaux ayant autorisé des prélèvements dans leurs chais.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D., SEDMAN J.G., SMITH J.A., STRUHL K., 1995. *In Short protocols in molecular biology* (John Wiley & sons, Inc., New-York).

BARBE J.C., DE REVEL G., JOYEUX A., LONVAUD-FUNEL A. and BERTRAND A., 2000. Role of carbonyl compounds in binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes. *J. Agric. Food. Chem.*, **48**, 3413-3419.

BARBE J.C., DE REVEL G. and BERTRAND A., 2002. Gluconic acid, its lactone and SO2 binding phenomena in must from botrytized grapes. *J. Agric. Food chem*., **50**, 6408-641.2

BENDA I., 1982. Wine and brandy. *In Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*. Ed. G. Reed 4th edn. AVI Publishing Co. Wesport, Conn., pp. 310-311.

CIANI A. and FERRARO L., 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 247-254.

COCOLIN L. and MILLS D.A., 2003. Wine yeast inhibition by sulfur dioxide : a comparison of culture-dependent and independent methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**,125-130.

DIVOL B. et LONVAUD-FUNEL A., 2003. Essai d'utilisation du Velcorin® comme agent du mutage des vins liquoreux. *In Œnologie 2003*. Tec et Doc ed. pp 462-465.

ESTEVE-ZARZOSO B., BELLOCH C., URUBURU F., QUEROL A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 329-337.

FERNANDEZ-GONZALEZ ., ESPINOSA J.C., UBEDA J.F., and BRIONES A.I., 2001. Yeasts present during wine fermentation: comparative analysis of conventional plating and PCR-TTGE. *Syst. Appl. Microbiol.*, **24**, 634-638.

FREZIER V., 1992. Recherches sur l'écologie des souches de *Saccharomyces cerevisiae* au cours des vinifications bordelaises. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux II.

FROUDIERE I., LARUE F. and LONVAUD-FUNEL A., 1990. Utilisation de l'épifluorescence pour la détection des microorganismes dans le vin. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, 43-46.

GINDREAU E., WALLING E. and LONVAUD-FUNEL, 2001. Direct polymerase chain reaction detection of ropy Pediococcus damnosus strains in wine. *J. Appl. Microbiol*., **90**, 535-542.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

JOLLY N.P., AUGUSTYN O.P.H. and PRETORIUS I.S., 2003. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **24**, 55-62.

LEGRAS J.L. and KARST F., 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol Lett.*, **221**, 249-55.

MCDOUGALD D., RICE S.A., WEICHART D. and KJELLBERG S., 1998. Nonculturability : adaptation or debilitation ? *FEMS Microbiol. Ecol.*, **25**, 1-9.

MILLET V. and LONVAUD-FUNEL A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, 136-141.

MILLS D.A., JOHANNSEN E.A. and COCOLIN L., 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4884-4893.

MOORE K.J., JOHNSON M.G. and MORRIS J.R., 1988. Indigenous yeast microflora on Arkansas White Riesling (*Vitis vinifera*) grapes and in model systems. *J. Food Sci.,* **53**, 1725-1728.

OLIVER J.D., 1993. Formation of viable but non culturable cells. *In : Starvation in bacteria*. Ed : Kjellberg S., Plenum press, New-York, pp. 239-271.

PEYNAUD E. and DOMERCQ S., 1959. A review of microbiological problems in wine-making in France. *Am. J. Enol. Vitic.*, **10**, 69-77.

PEYNAUD E. et LAFOURCADE S., 1952. Sur les conditions d'emploi de l'anhydride sulfureux dans les vins liquoreux. *Bull. OIV.*, **152**, 110-120.

PLAZA G., ULFIG K., HAZEN T.C. and BRIGMON R.L., 2001. Use of molecular techniques in bioremediation. *Acta Microbio.l Pol.*, **50**, 205-218

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBEREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1975. *In : Traité d'œnologie. Sciences et techniques du vin*. Tome 2. Ed Dunod, Paris.

SIPICZI M., 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 2079-2083.

Manuscrit reçu le 6 avril 2004 ; accepté pour publication, après modifications le 26 août 2004

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)