

NOUVELLES UTILISATIONS DU DMDC DANS LES VINS. PARTIE 2: BRETTANOMYCES

Alain BERTRAND

Faculté d'œnologie, Université de Bordeaux 2

Participent à ces expérimentations :

Lanxess, Pompes Lewa, Sofralab, Chambre d'agriculture de la Gironde, Faculté d'œnologie, Microflora.

Presenté à Enoforum 2009, 21-23 avril, Piacenza, Italy

2. ESSAIS POUR LUTTER CONTRE LES LEVURES DE CONTAMINATION

2.1. Essai 2006

2.1.1 Protocole

Cet essai a été mené sur deux cuves de 250 hl de vin rouge de Bordeaux
Traitement du vin à la dose de 200 mg/l lors d'un transfert de cuve à cuve
Traitement réalisé le 17/11/2006.

2.1.2 Analyses avant traitement

	Cuve 1 avant traitement	Cuve 2 avant traitement
Titre Alcoométrique volumique (%vol)	12,73	13,14
Sucres (g/l)	1,3	1,3
Acidité totale (g/l acide tartrique)	5,13	5,22
pH	3,70	3,62
Acidité volatile (g/l acide acétique)	0,40	0,37
SO2 total (mg/l)	31	37
SO2 libre (mg/l)	6	8
Levures Totales (UFC/ml) vivantes cultivables	2,0.10 ⁴	5,0.10 ⁴
Epifluorescence (microorganismes totaux vivants)	1,5.10 ⁶	3,2. 10 ⁶
Levures non <i>Saccharomyces</i>	25	26
Méthanol (mg/l)	168	178

2.1.3 Analyses 48 h après traitement

	Cuve 1 traitée	Cuve 2 traitée
Levures Totales (UFC/ml) vivantes cultivables	90	9,0.10 ²
1.3.5 Epifluorescence (microorganismes totaux vivants)	1,5.10 ⁵	1,4.10 ⁵
Levures non <i>Saccharomyces</i>	< 1	19
Méthanol (mg/l)	232	244
Carbonate de méthyléthyle (mg/l)	11,7	12,6
Carbamate de méthyle (µg/l)	3,8	3,1
Carbamate d'éthyle (µg/l)	1,2	1,1

2.1.4 Analyses 48 jours après traitement

Faites 48 jours après le traitement	Cuve 1 traitée	Cuve 2 traitée
Levures Totales (UFC/ml)	< 1	1
Levures non <i>Saccharomyces</i>	< 1	< 1

2.1.5 Observations

Les levures vivantes ont été réduites d'un facteur 100 par l'ajout de 200 mg/l de DMDC après 48 heures; les levures vivantes non cultivables sont à un niveau très élevé de l'ordre de 10^5 .

Un mois et demi après traitement il ne reste plus de levures vivantes cultivables ou non dans les deux cuves traitées.

La dégustation ne permet pas de mettre en évidence un effet significatif du traitement.

2.2. Essais 2007

Deux autres essais semblables à celui décrit ci-dessus ont été réalisés en grand volume l'un dans le Bordelais, l'autre dans la région de Narbonne (environ 200 hl) mais les populations de *Brettanomyces* étaient peu importantes (quelques dizaines par ml) et les résultats ont été les mêmes que ceux décrits ci-dessus.

Il nous a paru souhaitable de réaliser un essai laboratoire en grand volume avec une population de levures de contamination très importante.

Essai laboratoire en grand volume pour montrer l'efficacité du DMDC pour lutter contre les levures de contamination

2.2.1 Protocole

Nous avons d'abord procédé à l'élaboration d'un levain de *Brettanomyces* puis à l'inoculation d'un faible volume de vin et enfin à l'ensemencement de 8 hl de vin rouge. Après l'implantation de la souche, 7 hl de ce vin avec ont été traités par le DMDC à la dose de 200 mg/l, lors d'un transfert de cuve à cuve. 1hl a été conservé comme témoin.

Réalisation du traitement : 18/10/2007

2.2.2 Analyse du vin avant ensemencement

	VIN AVANT ENSEMENCEMENT
Titre Alcoométrique Volumique (%vol)	12,32
Sucres (Glucose + Fructose) (g/l)	1,1
Acidité totale (g/l acide tartrique)	4,95
Acidité volatile (g/l acide acétique)	0,53
pH	3,53
SO ₂ total (mg/l)	101
SO ₂ libre (mg/l)	13
<i>Brettanomyces</i> par PCR-Q (Cellules/ml)	Non détectées
4-Ethylphénol (µg/l)	313
4-Ethylgaiacol (µg/l)	28
4-Vinylphénol (µg/l)	23
4-Vinylgaiacol (µg/l)	9

2.2.3 Ensemencement et suivi de l'implantation :

Production de l'inoculum :

Le laboratoire Microflora a produit une crème de levures à partir d'une souche de *Brettanomyces* (souche LO417 de la Faculté d'œnologie de Bordeaux) puis a vérifié la bonne implantation de ces levures dans un volume de 10 l de vin. La concentration cellulaire était d'environ $2,4 \cdot 10^7$ cellules/ml. De l'acide para-coumarique (précurseur des phénols volatils) à 20 mg/l a été ajouté à la préparation.

Ensemencement de la cuve le et suivi de la population

Lors de l'ensemencement de la cuve avec l'inoculum de l'acide para-coumarique a été ajouté au vin à la dose de 20 mg/l.

Le suivi de la population de *Brettanomyces* par épifluorescence a été réalisé 2 fois par semaine.

DATE :	SUIVI DE LA POPULATION APRES ENSEMENCEMENT				
	27/09/07	01/10/07	04/10/07	08/10/07	11/10/07
JOURS :	0	5	8	12	15
<i>Brettanomyces</i> (Cellules/ml) Epifluorescence	0 (PCR-Q)	$6,8 \cdot 10^5$	$8,6 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$

2.2.4 Analyse du vin avant traitement

	VIN ENSEMENCE AVANT TRAITEMENT
<i>Brettanomyces</i> par PCR-Q (Cellules/ml)	$1,0 \cdot 10^7$
Méthanol (mg/l)	171
Carbonate de méthyléthyle (mg/l)	0
Carbamate de méthyle ($\mu\text{g/l}$)	0
Carbamate d'éthyle ($\mu\text{g/l}$)	9
4-Ethylphénol ($\mu\text{g/l}$)	4517
4-Ethylgaiacol ($\mu\text{g/l}$)	52
4-Vinylphénol ($\mu\text{g/l}$)	1149
4-Vinylgaiacol ($\mu\text{g/l}$)	28

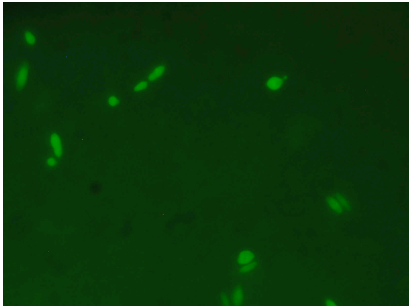
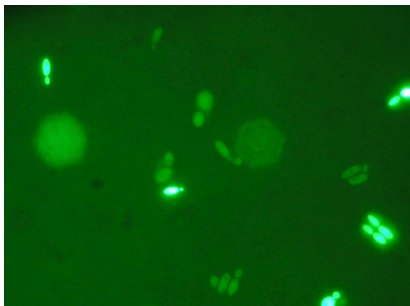
2.2.5 Analyses du vin une semaine après traitement

	VIN ENSEMENCE TRAITE	TEMOIN ENSEMENCE NON TRAITE
<i>Brettanomyces</i> par PCR-Q (Cellules/ml)	$7,3 \cdot 10^6$ *	$1,5 \cdot 10^7$ *
Méthanol (mg/l)	256	176
Carbonate de méthyléthyle (mg/l)	13	0
Carbamate de méthyle ($\mu\text{g/l}$)	3	0
Carbamate d'éthyle ($\mu\text{g/l}$)	10	10
4-Ethylphénol ($\mu\text{g/l}$)	4278	5685
4-Ethylgaiacol ($\mu\text{g/l}$)	51	61
4-Vinylphénol ($\mu\text{g/l}$)	597	1409
4-Vinylgaiacol ($\mu\text{g/l}$)	20	24

* 25/10/2007 : Réajustement du SO_2 libre à environ 20 mg/l soit 0,4 mg/l de SO_2 actif

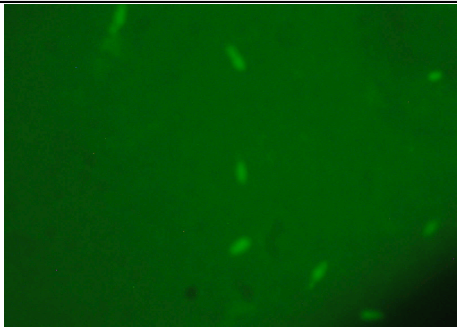
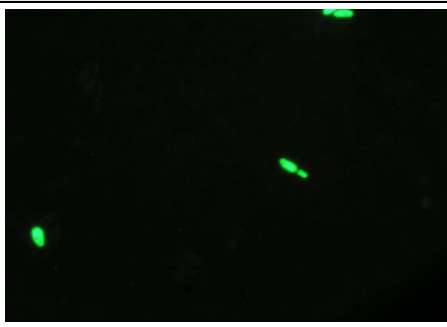
* Numération par PCR-Q faite le 24/10/2007

Sur les échantillons de chaque modalité, un comptage par épifluorescence a été réalisé le 31/10/2007.

	VIN ENSEMENCE TRAITE	TEMOIN ENSEMENCE NON TRAITE
Photo		
Comptage	$2,4 \cdot 10^6$ Cellules/ml	$2,0 \cdot 10^6$ Cellules/ml
Observation	Cellules à fluorescence résiduelle	Cellules à forte fluorescence

2.2.6 Analyses un mois après traitement

	VIN ENSEMENCE TRAITE	TEMOIN ENSEMENCE NON TRAITE
<i>Brettanomyces</i> par PCR-Q (Cellules/ml)	$1,1 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$
<i>Non-Saccharomyces</i> (UFC/ml)	< 1	$1,6 \cdot 10^5$
4-Ethylphénol (µg/l)	4354	6896
4-Ethylgaiacol (µg/l)	65	90
4-Vinylphénol (µg/l)	1005	1073
4-Vinylgaiacol (µg/l)	245	160

	VIN ENSEMENCE TRAITE	TEMOIN ENSEMENCE NON TRAITE
Photo		
Comptage	$1,5 \cdot 10^4$ Cellules/ml	$7,5 \cdot 10^5$ Cellules/ml
Observation	Cellules à fluorescence résiduelle	Cellules à forte fluorescence

2.2.7 Analyses trois mois après traitement

	VIN ENSEMENCE TRAITE	TEMOIN ENSEMENCE NON TRAITE
<i>Brettanomyces</i> par PCR-Q (Cellules/ml)	1,3.10 ⁵	1,8.10 ⁵
<i>Non-Saccharomyces</i> (UFC/ml)	< 1	2. 10 ³
4-Ethylphénol (µg/l)	3939	6431
4-Ethylgaiacol (µg/l)	68	96
4-Vinylphénol (µg/l)	113	391
4-Vinylgaiacol (µg/l)	15	24

2.2.8 Analyse 5 mois après traitement : 06/03/2008

	VIN ENSEMENCE TRAITE	TEMOIN ENSEMENCE NON TRAITE
<i>Brettanomyces</i> par PCR-Q (Cellules/ml)	1,7.10 ⁵	1,5.10 ⁶
<i>Non-Saccharomyces</i> (UFC/ml)	3,8.10 ³	2,7.10 ³

Le traitement par le DMDC a eu pour effet essentiel de stopper le métabolisme de *Brettanomyces*. Après trois mois, même si il reste une population viable importante, il n'y a toujours pas de levure cultivable. En revanche après 5 mois il existe de nouveau des levures *non saccharomyces* cultivables. Il s'avère que cette cuve était en vidange et ne contenait plus de SO₂ libre.

Conclusion

La dose de 200 mg/l de DMDC utilisée dans cet essai n'a pas été suffisante pour détruire une population atteignant 10⁷ levures par ml de type *Brettanomyces*. Dans la pratique il est rare que la population dépasse 10³ levures par ml. Il est indispensable d'associer le DMDC avec le SO₂ pour lutter efficacement contre le développement des *Brettanomyces*. De nombreux auteurs préconisent l'utilisation de SO₂ à la dose de 0,6 mg/l de SO₂ actif soit 33 mg/l de SO₂ libre pour un vin à pH 3,55 et 60 mg/l pour un vin à pH 3,8 ; cette teneur peut être réduite d'un tiers dans le cas d'un traitement conjoint avec le DMDC. Selon Renouf et al. (2008), dans un vin à pH 3.58, une population de 10³ UFC de *Brettanomyces* est éliminée par le traitement au DMDC en présence de 0,3 mg/l de SO₂ actif, au bout de 7 jours, il ne reste plus de cellules cultivables, ce résultat étant confirmé après 6 mois y compris par PCR.

Enfin, rajouté à la mise en bouteilles, selon Blateyron et al. (2008), le DMDC assure une bonne stabilité du vin vis-à-vis des *Brettanomyces* dès que le SO₂ actif atteint 0,4 mg/l.

CONCLUSION GENERALE

Outre son utilisation lors de la mise en bouteilles, pour obtenir un vin stable d'un point de vue microbiologique, le DMDC peut être employé en vinification pour le mutage des vins doux, ce qui rendrait inutile l'emploi d'acide sorbique, mal accepté dans certains pays et qui reste très dangereux si des bactéries lactiques sont présentes. Par ailleurs, la garde en fût pourrait se faire en limitant réellement les risques de contamination par les levures de type *Brettanomyces* à condition que le DMDC soit associé à une dose de SO₂ actif de 0,4 mg/l ce qui réduit d'un tiers le taux de SO₂ libre nécessaire et pourrait résoudre le problème des vins rouges à pH élevé très sensibles aux altérations.

BIBLIOGRAPHIE

Renouf V., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A., (2008),
Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces*
bruxellensis growth in wine. *Food control* 18, 208-216.

Blateyron L., Moreau F., Canivenc G. et Aliot R.(2008)
Caractérisation génotypique des souches de *brettanomyces* dans des vins méditerranéens et de la vallée du
rhône. Mise en évidence de l'intérêt du DMDC pour leur élimination dans les vins rouges. *Rev. F Œnologie* 230,
1-7.